

**ANÁLISIS DEL INTERCAMBIO GASEOSO Y FLUORESCENCIA DE LA
CLOROFILA *a* DE *Hevea brasiliensis* EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR
Microcyclus ulei EN CONDICIONES CONTROLADAS DE INFECCIÓN**

ARMANDO STERLING CUÉLLAR

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS BÁSICAS
ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA APLICADA
BOGOTÁ D.C.
2017**

**ANÁLISIS DEL INTERCAMBIO GASEOSO Y FLUORESCENCIA DE LA
CLOROFILA *a* DE *Hevea brasiliensis* EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR
Microcyclus ulei EN CONDICIONES CONTROLADAS DE INFECCIÓN**

ARMANDO STERLING CUÉLLAR

**Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Estadística
Aplicada**

**Director: Manuel Francisco Romero Ospina
Magíster en Bioinformática y Bioestadística**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS BÁSICAS
ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA APLICADA
BOGOTÁ D.C.
2017**

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi por el uso del Laboratorio de Fitopatología de la Sede Florencia, la disponibilidad del material vegetal, el acceso a la fuente de inóculo y facilitar los equipos de fisiología vegetal requeridos para el desarrollo de esta investigación.

Al profesor Manuel de la Fundación Universitaria Los Libertadores, por los cursos orientados en la línea de bioestadística y por ser el tutor de mi trabajo de grado a quien agradezco muy especialmente su comprensión, orientación y apoyo brindado.

A los profesores de la Especialización en Estadística Aplicada modalidad virtual por sus enseñanzas estadísticas y la orientación especializada para construir el presente documento acorde con los lineamientos académicos y científicos de la Fundación Universitaria Los Libertadores.

A la Fundación Universitaria Los Libertadores por permitirme acceder a esta modalidad de educación en estadística primera en el país, gracias a la cual pude adquirir los conocimientos y habilidades que se plasman en el presente documento final de la especialización.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. General	13
2.2. Específicos	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. MARCO TEÓRICO	15
4.1. Marco disciplinar	15
4.1.1. Fisiología vegetal	15
4.1.2. Efectos de los patógenos sobre la fisiología de las plantas	15
4.1.3. El caucho natural (<i>Hevea brasiliensis</i>)	15
4.1.4. Mal suramericano de las hojas (SALB)	16
4.1.5. Interacción <i>Hevea brasiliensis</i> x SALB	17
4.1.6. Curvas de progreso de la enfermedad	18
4.2. Marco estadístico	19
4.2.1. Diseño de experimentos	19
4.2.2. Análisis de la varianza	21
4.2.3. Análisis de correlación	23
4.2.4. Análisis de componente principales	24
5. MARCO METODOLÓGICO	26
5.1. Adecuación de las condiciones experimentales	26
5.2. Material vegetal	26
5.3. Fuente de inóculo e inoculaciones controladas	27
5.4. Evaluación de la severidad de la enfermedad	27
5.5. Mediciones de intercambio gaseoso	28
5.6. Mediciones de fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	29
5.7. Diseño experimental	30
5.8. Análisis estadísticos	30
6. ANÁLISIS Y RESULTADOS	33
6.1. Severidad de los síntomas del SALB y AUSPC	33
6.2. Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	35
6.3. Relación entre los síntomas del SALB y los parámetros fotosintéticos	41
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
8. LISTA DE REFERENCIAS	46
ANEXOS	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cuarto climatizado con cubículos para las inoculaciones controladas	25
Figura 2. Fuente de inóculo de <i>M. ulei</i> (izquierda) y pruebas de inoculación controlada (derecha).	26
Figura 3. Mediciones de intercambio gaseoso utilizando el equipo portátil de intercambio de gases IRGA de tipo abierto (TPS 2, PP Systems, USA).	27
Figura 4. Mediciones de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> utilizando un fluorómetro portátil de pulso modulado (Hansatech, Hoddesdon, Inglaterra)	28
Figura 5. Validación gráfica para los supuestos estadísticos del anova para las variables severidad del SALB (izquierda) y AUSPC (derecha).	33
Figura 6. Curva de progreso de la severidad del SALB (fase conidial: <i>Fusicladium heveae</i>) (a) y área bajo la curva de progreso del SALB (AUSPC) (b), para dos clones de caucho (<i>Hevea brasiliensis</i>) en condiciones de inoculación controlada. $4 \leq \text{DDI} \leq 8$, folíolos B (14 -18 días de edad). $8 < \text{DDI} \leq 20$, folíolos C (19 – 30 días de edad). Medias para FX 3864 (susceptible) y FX 4098 (moderadamente resistente) seguidas por letras distintas para cada evaluación en el tiempo o por un asterisco, fueron significativamente diferentes (Prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media; $n = 5$	35
Figura 7. Validación gráfica para los supuestos estadísticos del anova para las variables de intercambio gaseoso: tasa de asimilación neta (<i>A</i>), tasa transpiratoria (<i>E</i>), conductancia estomática (<i>g_s</i>) y uso eficiente del agua (<i>WUE</i>)	36
Figura 8. Validación gráfica para los supuestos estadísticos del anova para las variables de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> : rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m);	

eficiencia en la captura de la energía de excitación para los centros de reacción abiertos del PSII (F_v/F_m); quenching fotoquímico (q_p); quenching no fotoquímico (NPQ); tasa de transporte de electrones (ETR)

37

Figura 9. Tasa de asimilación neta de CO₂ (A) (a, b); conductancia estomática a vapor de agua (g_s) (c, d); tasa de transpiración (E) (e, f); y uso eficiente del agua (WUE) (g, h) para folíolos de plantas de caucho (*Hevea brasiliensis*) de los clones FX 4098 (moderadamente resistente) (a, c, e, g) y FX 3864 (susceptible) (b, d, f, h), inoculados (I) y no inoculados (NI) con *Microcyclus ulei* (fase conidial: *Fusicladium heveae*) en condiciones controladas. $4 \leq \text{DDI} \leq 8$, folíolos B (14 -18 días de edad). $8 < \text{DDI} \leq 20$, folíolos C (19 – 30 días de edad). Medias para los clones FX 4098 y FX 3864 seguidos por un triángulo invertido y para los tratamientos I y NI seguidos por un asterisco (*) para cada evaluación en el tiempo fueron significativamente diferentes (Prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media; $n = 5$.

39

Figura 10. Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m) (a, b); eficiencia en la captura de la energía de excitación para los centros de reacción abiertos del PSII (F_v/F_m) (c, d); quenching fotoquímico (q_p) (e, f); quenching no fotoquímico (NPQ) (g, h); tasa de transporte de electrones (ETR) (i, j) para folíolos de plantas de caucho (*Hevea brasiliensis*) de los clones FX 4098 (parcialmente resistente) (a, c, e, g, i) y FX 3864 (susceptible) (b, d, f, h, j), inoculados (I) y no inoculados (NI) con *Microcyclus ulei* (Fase conidial: *Fusicladium heveae*) en condiciones controladas. $4 \leq \text{DDI} \leq 8$, folíolos B (14 -18 días de edad). $8 < \text{DDI} \leq 20$, folíolos C (19 – 30 días de edad). Medias para los clones FX 4098 y FX 3864 seguidos por un triángulo invertido y para los tratamientos I y NI seguidos por un asterisco (*) para cada evaluación en el tiempo fueron significativamente diferentes (Prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media; $n = 5$.

40

Figura 11. Porcentaje de variabilidad capturada con las primeras cuatro componentes de un análisis de componentes principales realizado sobre la matriz de correlaciones de 10 variables (severidad y nueve fisiológicas) en relación con la combinación clon – tratamiento

43

Figura 12. Análisis de componentes principales (gráfico biplot) con 10 variables (una fitosanitaria y nueve fisiológicas) en relación con la combinación clon – tratamiento. Clave: tasa de asimilación neta de CO₂ (*A*), conductancia estomática a vapor de agua (*gs*), tasa de transpiración (*E*), uso eficiente del agua (*WUE*), rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (*Fv/Fm*), eficiencia en la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del PSII (*Fv'/Fm'*), coeficientes de los quenching fotoquímico (*qP*) y no fotoquímico (*NPQ*) y tasa de transporte de electrones (*ETR*).

44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Análisis de varianza de los efectos clon (C), tratamiento (T), tiempo de muestreo (TM), y sus interacciones, para severidad, área bajo la curva de progreso del SALB (AUSPC), tasa de asimilación neta de CO ₂ (A), conductancia estomática a vapor de agua (g_s), tasa de transpiración (E), uso eficiente del agua extrínseco (WUE_e), rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m), eficiencia en la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del PSII (F_v'/F_m'), coeficientes de los quenching fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ) y tasa de transporte de electrones (ETR).	34
Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson para el estadio foliar B (10 -18 días de edad) (arriba de la diagonal) y el estadio foliar C (19 -30 días de edad) (abajo de la diagonal), entre la severidad del SALB, A, g_s , E y WUE medidos en plantas de caucho (<i>Hevea brasiliensis</i>) del clon FX 3864 (susceptible) inoculadas con <i>Microcyclus ulei</i> (Fase conidial: <i>Fusicladium heveae</i>).	41
Tabla 3 Coeficientes de correlación de Pearson para el estadio foliar B (10 -18 días de edad) (arriba de la diagonal) y el estadio foliar C (19 -30 días de edad) (abajo de la diagonal), entre la severidad del SALB, F_v/F_m , F_v'/F_m' , qP , NPQ y ETR medidos en plantas de caucho (<i>Hevea brasiliensis</i>) del clon FX 3864 (susceptible) inoculadas con <i>Microcyclus ulei</i> (Fase conidial: <i>Fusicladium heveae</i>).	42
Tabla 4 Autovalores y proporción de la variabilidad capturada mediante un análisis de componentes principales	42
Tabla 5 Coeficientes de los vectores característicos asociados a los dos primeros componentes principales	43
Tabla 6 Coeficientes de correlación de las variables originales con las dos primeras componentes principales	43

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Sentencias en RStudio para el análisis de varianza de la severidad y el AUSPC	53
Anexo 2. Sentencia general en RStudio para el análisis de varianza de los parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	55
Anexo 3. Sentencias en RStudio para el análisis de correlación y de componentes principales entre el SALB y los parámetros fisiológicos	56
Anexo 4. Medias ajustadas y errores estándares para las variables de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila <i>a</i> para la interacción de mayor orden: Tiempo*Clon*Tratamiento	58

RESUMEN

El mal suramericano de las hojas (SALB) causado por el hongo *Microcyclus ulei*, es la principal enfermedad del caucho en Latinoamérica. La mayoría de los estudios se han concentrado en la resistencia al patógeno por lo que aún se desconocen muchos aspectos fisiológicos involucrados en el proceso de infección. El presente estudio tuvo como objetivo determinar a partir del uso de modelos lineales generales con análisis de anova y medidas repetidas en el tiempo, análisis de correlación y componentes principales, los cambios en los parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila a en dos clones de *H. brasiliensis* ante la infección producida por *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada. Los resultados mostraron que la afectación de la fotosíntesis fue proporcional al progreso temporal y a la intensidad de los síntomas de la enfermedad. En este sentido, la máxima reducción significativa ($p < 0.05$) en las tasas fotosintéticas del clon FX 3864 (susceptible) (88.3%) y del FX 4098 (moderadamente resistente) (45.2%) se observaron a los 8 días después de la inoculación en folíolos B de 18 días de edad. Así mismo, se encontró una diferenciación significativa en la habilidad para capturar, usar y disipar la energía lumínica por parte del fotosistema II entre ambos clones, lo cual se evidenció en la menor fotosíntesis del clon susceptible. En general, el SALB, estuvo principalmente correlacionado con las variables A , E , g_s , F_v/F_m y NPQ, y asociado principalmente al clon FX 3864 que fue el más afectado fisiológicamente.

Palabras clave: Caucho, mal suramericano de las hojas – fotosíntesis – modelos lineales generales – Análisis de componentes principales

ABSTRACT

The main disease of rubber tree cultivation in Latin America, South American leaf blight (SALB), is caused by the fungus *Microcyclus ulei*. Most studies have focused on the mechanisms related with the resistance to the pathogen, so that physiological aspects involved in the infection is still unknown. This study aimed to determine the changes in parameters of gas exchange and chlorophyll a fluorescence of two clones of *H. brasiliensis* to the infection produced by *M. ulei* under conditions of controlled inoculation with use of general linear models with analysis of variance and measures repeated over time, correlation analysis and principal components. The results showed that the effect of the photosynthesis was proportional to the temporal progress and to the intensity of the disease symptoms. In this regard, the maximum significant reduction ($p < 0.05$) in photosynthetic rates of the clone FX 3864 (susceptible) (88.3%) and of the FX 4098 (moderately resistant) (45.2%) were observed at 8 days after inoculation in leaflets B of 18 days old. Likewise, a significant difference was found in the ability to capture, use and dissipate light energy by part of the photosystem II between the two clones, which was evidenced in the minor photosynthesis of the susceptible clone. In general, the SALB was mainly correlated with the variables A , E , g_s , F_v/F_m and NPQ, and was mainly associated with the FX 3864 rubber tree clone that was the most affected physiologically.

Key Word: Rubber tree - South American Leaf Blight - Photosynthesis - General linear models – Principal components analysis

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mal suramericano de las hojas por sus siglas en inglés SALB (South American Leaf Blight), causado por el hongo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx (anamorfos: *Fusicladium heveae* Kuyper y *Aposphaeria ulei* P. Henn) es la principal enfermedad del cultivo de caucho [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg en Latinoamérica (Gasparotto et al. 1997)]. Esta enfermedad reviste gran importancia porque produce defoliaciones prematuras repetidas, disminuye la producción de látex entre un 20% y 75% y puede ocasionar la muerte de la planta (Chee y Holliday 1986; Lieberei 2007).

Los estudios en el SALB se han concentrado principalmente en los mecanismos bioquímicos y moleculares relacionados con la resistencia a la enfermedad (Lieberei 2007; Rivano et al. 2013), el tipo de reacción clonal (Mattos et al. 2003; Le Guen et al. 2008; Sterling et al. 2010; Cardoso et al. 2014) y la influencia de las condiciones ambientales en la dinámica epidemiológica de la enfermedad (Gasparotto et al. 1989; Furtado et al. 2008; Sterling et al. 2015). Por lo que aún se desconocen muchos de los aspectos fisiológicos involucrados en la interacción *H. brasiliensis*-*M. ulei* (Sterling y Melgarejo 2014).

Los parámetros fotosintéticos relacionados con el intercambio gaseoso y la fluorescencia de la clorofila *a* han sido considerados indicadores no invasivos de la respuesta fotosintética bajo condiciones de estrés biótico por patógenos (Bonfing et al. 2006; Berger et al. 2007; Alves et al. 2011). En este sentido, el análisis de estos indicadores ha demostrado que la infección por patógenos ocasiona reducciones en las tasas fotosintéticas y causa modificaciones en el aparato fotosintético (Alves et al. 2011; Aucique Perez et al. 2014; Rios et al. 2014; Bermúdez-Cardona et al. 2015).

Dado que el uso de clones con resistencia al SALB constituye una de las estrategias más prometedoras para el manejo de la enfermedad (Rivano et al. 2010, 2013; Sterling y Rodríguez 2011; Cardoso et al. 2014), es presumible que los efectos fisiológicos de *M. ulei* sobre la fisiología de *H. brasiliensis* deben ser menos evidentes en los materiales con menor susceptibilidad a la enfermedad.

De acuerdo con lo anterior, se observa que es necesario analizar ¿cómo el uso de clones de caucho con algún nivel de resistencia al hongo *M. ulei* podrían reducir los impactos negativos sobre la fotosíntesis, y qué cambios en la fotosíntesis se pueden explicar en función del tiempo de progreso de la enfermedad en condiciones controladas de infección?

2. OBJETIVOS

2.1. General

Analizar en función de los parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila *a*, la respuesta fotosintética de dos clones de *H. brasiliensis* (FX 4098 y FX 3864) con diferente resistencia al SALB, ante la infección producida por *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada.

2.2. Específicos

- Evaluar mediante análisis de varianza (anova) la evolución temporal de los síntomas del SALB y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad en los clones FX 4098 y FX 3864 en condiciones controladas de infección.
- Analizar a través de anova los cambios en el intercambio gaseoso y la fluorescencia de la clorofila *a* de los clones FX 4098 y FX 3864 en función del progreso temporal de los síntomas producidos por *M. ulei* en condiciones controladas de infección.
- Determinar mediante análisis de correlación y componentes principales la relación entre los síntomas producidos por el SALB y los parámetros fotosintéticos de los clones FX 4098 y FX 3864 en condiciones controladas de infección.

3. JUSTIFICACIÓN

Como en muchos países de Latinoamérica, el cultivo del caucho natural en Colombia ha adquirido importancia en los últimos años debido a las iniciativas adelantadas por las entidades regionales que han encontrado en la actividad heveícola un apoyo fundamental para el desarrollo económico del sector agropecuario e industrial. Esta situación obliga al sector heveícola a ampliar las áreas de siembra mediante el establecimiento y selección de clones de alto desempeño, tolerantes a las principales limitantes fitosanitarias del cultivo, especialmente al SALB.

En Colombia, el gobierno nacional priorizó diversos núcleos de producción, teniendo en cuenta la tradición cauchera y la delimitación por zonas de escape y no escape al hongo *M. ulei* (STNCC, 2008). En esta priorización se incluyó la Amazonia colombiana especialmente los departamentos de Caquetá, Putumayo y Guaviare, los cuales se ubican principalmente en zona de no escape al SALB. En consideración de las potenciales limitaciones presentes en la zona antes referida, el conocimiento de la respuesta fotosintética a partir del análisis de los parámetros de intercambio gaseoso y de la fluorescencia de la clorofila *a* en diferentes clones de caucho frente al ataque del SALB, permitirá *a posteriori* desarrollar un sistema de diagnóstico fisiológico, monitoreo y manejo temprano de la enfermedad en combinación con las estrategias clásicas de manejo a través del uso de clones resistentes, con lo que se favorecerá la productividad y la competitividad del sector cauchero del Caquetá en función de una reducción en el impacto ocasionado por el SALB en condiciones de la Amazonia colombiana.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Marco disciplinar

4.1.1. Fisiología vegetal

Según Azcón - Bieto y Talón (2000), la fisiología vegetal es la ciencia que estudia cómo funcionan las plantas. Explica a través de leyes físicas y químicas cómo las plantas son capaces de utilizar la energía de la luz para sintetizar moléculas orgánicas. Explica también cómo las plantas, siguiendo un programa de desarrollo endógeno, son capaces de reproducirse y cómo adaptan dicho programa al ambiente particular de cada momento.

4.1.2. Efectos de los patógenos sobre la fisiología de las plantas

Son evidentes los efectos fisiológicos que causan los patógenos en las plantas, pero muchos de los eventos que ocurren están poco documentados o entendidos (Rodríguez-Gaviria y Cayón, 2008). Según Agrios (2005), la fotosíntesis es uno de los principales atributos fisiológicos afectados por los patógenos. En este sentido, los parámetros fotosintéticos relacionados con el intercambio gaseoso y la fluorescencia de la clorofila *a* han sido considerados indicadores ideales y no invasivos de la respuesta fotosintética bajo condiciones de estrés biótico por patógenos (Bonfing et al. 2006; Berger et al. 2007; Alves et al. 2011).

El análisis de estos indicadores ha demostrado que la infección por patógenos ocasiona reducciones en las tasas fotosintéticas y causa modificaciones en el aparato fotosintético (Alves et al. 2011; Aucique Perez et al. 2014; Rios et al. 2014; Bermúdez-Cardona et al. 2015). Estas modificaciones pueden deberse a la regulación negativa o al daño del aparato fotosintético (Lichtenthaler y Miehe 1997; Alves et al. 2011). El análisis de la fluorescencia de la clorofila *a* ha demostrado, por ejemplo, que la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) es disminuida por la infección (Bassanezi et al. 2003; Alves et al. 2011; Aucique Perez et al. 2014).

4.1.3. El caucho natural (*Hevea brasiliensis*)

El caucho natural *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg. (Euforbiaceae) es una especie originaria de la cuenca del río Amazonas, en los territorios de Brasil, Bolivia, Perú y Colombia, y su uso radica en la producción de látex destinado principalmente a la industria llantera (Compagnon 1998). El caucho natural fue llevado a Asia en donde logró gran adaptación y mejor comportamiento que en su lugar de origen, debido principalmente a que esa región se encuentra

libre del SALB, enfermedad endémica del área amazónica (Gasparotto et al. 1997). El Sudeste Asiático produce el 93% del caucho natural, África el 4% y América Central y del Sur el 3 % (IRSG 2015). En Colombia, a diciembre de 2015 se reportó la existencia de 52.223 ha cultivadas (CCC 2015). Caquetá es el departamento con mayor tradición cauchera de Colombia y el tercero en área sembrada (6.017 ha de caucho) (Asoheca, 2015).

4.1.4. Mal suramericano de las hojas (SALB)

El SALB causado por el hongo *M. ulei* es la principal enfermedad del caucho natural y se encuentra distribuida en todas las zonas productoras de caucho natural (*Hevea* spp.) de América Central y del Sur, en donde representa el principal limitante para el establecimiento de nuevos cultivos en estas regiones (Gasparotto et al. 1997, 2012). Este hongo, endémico de Centro y Sudamérica, fue inicialmente identificado en árboles de caucho del Brasil en 1904. La clasificación taxonómica del hongo se ha realizado con base en la forma perfecta o fase telomórfica que es la correspondiente a *Microcyclus ulei* (P. Henn) v. Arx, sin. *Dothidella ulei* P. Henn (Gasparotto et al. 2012).

Según Ericsson y Hawksworth (1993), el hongo pertenece a la clase Ascomycete, orden Mycosphaerellales y familia Mycosphaerellaceae. *M. ulei* posee dos estados asexuales: un estado conidial, *Fusicladium macrosporum* Kuyper 1912 y un estado picnidial, *Aposphaeria ulei* P. Henn. El género *Microcyclus* fue incluido en la familia Mycosphaerellaceae por quienes lo consideraron la contraparte estromática de la familia Mycosphaerellaceae (Dothideales).

Sin embargo, Hora Júnior et al. (2014) a través de análisis de relaciones filogenéticas usando secuencias de ADN y ARNr, proponen una nueva nomenclatura para *M. ulei*: *Pseudocercospora ulei* (Henn.) Hora Junior & Mizubuti, perteneciente al Orden Capnariales y conservando la familia Mycosphaerellaceae. En el mismo sentido, conservan la denominación del anamorfo conidial (*F. macrosporum* \equiv *F. heveae* K. Schub. & U. Braun 2003) y en el caso del anamorfo *A. ulei*, afirman que las estructuras picnidiales producidas por este estadio de desarrollo son en realidad espermogonios y estarían estrechamente relacionados con las etapas iniciales del ciclo sexual de *M. ulei*.

EL SALB reviste gran importancia porque produce defoliaciones prematuras repetidas, disminuye la producción de látex entre un 20% y 75% y puede ocasionar la muerte de la planta (Chee y Holliday 1986; Lieberei 2007). Según Gasparotto et al. (2012), dependiendo del clon de caucho, la primera fase de la enfermedad o fase infecciosa, ocurre luego de 4 a 10 días después de la infección, a partir de la cual aparecen lesiones conidiales polvosas producidas por *F. heveae* en los estadios foliares jóvenes B (10 -18 días de edad) y C (19 - 30 días de edad) (Hallé et al. 1978). En la segunda fase (dos meses después de la infección), en foliolos D con madurez fisiológica (60 - 90 días de edad), se presentan lesiones estromáticas

asexuales (picnidios) causadas por *A. ulei*, y finalmente en la tercera fase (tres a cuatro meses posteriores a la infección) se producen lesiones estromáticas sexuales en folíolos D próximos a la senescencia (90 – 120 días de edad) que portan las ascosporas con las que se iniciará un nuevo ciclo de la enfermedad.

El uso de genotipos resistentes y la ubicación de las plantaciones en las áreas de escape, definidas éstas como áreas cuyas condiciones climáticas son desfavorables a *M. ulei*, pero económicamente aptas para el crecimiento del cultivo de caucho, constituyen las mejores alternativas recomendadas para el control de la enfermedad (Leal, 1999).

4.1.5. Interacción *Hevea brasiliensis* x SALB

Los estudios en el SALB se han concentrado principalmente en los mecanismos bioquímicos y moleculares relacionados con la resistencia a la enfermedad (Lieberei 2007; Rivano et al. 2013), el tipo de reacción clonal (Mattos et al. 2003; Le Guen et al. 2008; Sterling et al. 2010; Cardoso et al. 2014) y la influencia de las condiciones ambientales en la dinámica epidemiológica de la enfermedad (Gasparotto et al. 1989; Furtado et al. 2008; Sterling et al. 2015). Por lo que aún se desconocen muchos de los aspectos fisiológicos involucrados en la interacción *H. brasiliensis*-*M. ulei*.

Dado que *M. ulei* es un patógeno hemibiotrófico que coloniza principalmente los tejidos foliares vivos, se presume que, a partir del proceso infeccioso, cambios importantes deben ocurrir a través del tiempo en la fisiología del caucho, derivados de los mecanismos de defensa del hospedero (Lieberei, 2007) y de la variación temporal de los síntomas y signos producidos por el patógeno (Sterling y Melgarejo 2014).

En otras interacciones hospedero-patógeno hemibiotrófico, los mayores efectos fisiológicos sobre el hospedero se han observado principalmente en la fotosíntesis (Pinkard y Mohammed 2006; Polanco et al. 2014). No obstante, el ataque por patógenos afecta también de forma negativa otros procesos fisiológicos como la respiración, la translocación de agua y nutrientes y la transpiración (Lucas 1998).

Lieberei (1996) evaluó en condiciones controladas diferentes aspectos fisiológicos de la resistencia (contenido de clorofila, fotosíntesis, respiración, peso fresco y peso seco), asociados al estado fenológico de las hojas afectadas. Sin embargo, no está documentado el efecto que tiene la intensidad de los síntomas de la enfermedad sobre el desempeño fotosintético de la planta, y tampoco se tiene claridad sobre los cambios en la fotosíntesis en relación con el progreso de la infección o el ciclo de desarrollo del patógeno en la planta. En este contexto, es necesario identificar las variaciones fotosintéticas entre diferentes genotipos de *H. brasiliensis* con distintos niveles de resistencia al SALB.

4.1.6. Curva de progreso de la enfermedad - SALB

En epidemiología es posible modelar el comportamiento de una enfermedad (incidencia o intensidad de síntomas) en función del tiempo de progreso de la misma, lo que se denomina curvas de progreso de la enfermedad a lo largo del tiempo. Asimismo, a partir de estas curvas epidemiológicas se puede calcular el área bajo la curva del progreso de la enfermedad por sus siglas en inglés AUDPC (Area under the disease progress curve), a través de la integración trapezoidal de la curva de progreso de la enfermedad (proporción acumulada de la enfermedad en el tiempo) mediante la fórmula propuesta por Campbell y Madden (1990):

$$\text{Ecuación (1): } \text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} [(Y_i + Y_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)]$$

Donde:

n = Número de observaciones.

Y_i = proporción de la enfermedad en la lectura i.

t_i = Tiempo en días transcurrido desde la lectura i a la lectura i + 1.

Los valores más altos de AUDPC corresponden a los clones más susceptibles y los clones con valores más bajos a los más resistentes (Pérez y Forbes 2008).

En caucho son pocos los estudios donde se han analizado la dinámica epidemiológica del SALB (Furtado et al. 2008) y en Colombia este conocimiento se encuentra poco documentado y ha sido principalmente abordado en condiciones de campo (Castro 2011, Sterling et al. 2015).

4.2. Marco estadístico

4.2.1. Diseño de experimentos

Un experimento es una prueba o serie de pruebas en las cuales se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida” (Montgomery 2004). Es una reproducción restringida de la realidad con el fin de observar los efectos de su manipulación planificada. La finalidad de estudios basados en experimentos es contrastar hipótesis, modelar y predecir.

El diseño de experimentos consiste en un conjunto de técnicas que tienen, entre otras, la finalidad de controlar las fuentes de variación no deseadas y disminuir el término de error experimental. Uno de los principales objetivos en la planificación de una experiencia, siguiendo un diseño experimental, es la reducción del error experimental, con el propósito de incrementar la eficiencia de la inferencia relacionada a la comparación de tratamientos (Kuehl 2001).

Para realizar un experimento se debe tener en cuenta las siguientes variables, describe Montgomery (2004):

- Determinar cuáles son las variables que tienen mayor influencia en la respuesta.
- Determinar cuál es el ajuste de la variable independiente (x) que tiene mayor influencia para que la variable dependiente (y) este casi siempre del valor deseado.
- Determinar cuál es el ajuste de la variable independiente (x) que tienen mayor influencia para que la variable dependiente (y) este reducida.
- Determinar cuál es el ajuste de la variable independiente (x) que tiene mayor influencia para que los efectos de las variables no controladas $Z_1, Z_2 \dots Z_q$ sean mínimos.

El diseño experimental puede entenderse como una estrategia de combinación de la estructura de tratamientos (factor/es de interés) con la estructura de unidades experimentales (UE), de manera tal que la variabilidad de la variable respuesta, al menos en algún subgrupo de unidades experimentales, pueda ser atribuidas solamente a la acción de los tratamientos, excepto por errores aleatorios. Así, es posible contrastar (comparar) medias de tratamientos o combinaciones lineales de medias de tratamientos con el menor “ruido” posible (Di Rienzo et al. 2008).

La estructura de tratamientos está relacionada al número de factores involucrados en el experimento, sus niveles y la combinación de los mismos. La estructura de unidades experimentales surge del agrupamiento de las mismas en grupos o bloques que puedan considerarse formados por UE homogéneas. Es importante en toda situación donde se diseña una experiencia distinguir entre la estructura de parcelas o estructura de las UE por un lado, y la estructura de tratamientos, por el otro (Di Rienzo et al. 2008).

Según Balzarini et al. (2011), el uso de experimentos factoriales implica un reconocimiento de la estructura de tratamientos que hace al análisis más eficiente en cuanto a las comparaciones de interés entre los tratamientos. Es posible evaluar la respuesta en relación a los niveles de cada uno de los factores (efectos principales) y la interacción entre factores o cambios en las comparaciones de los niveles de un factor entre los distintos niveles de otro/s factor/es.

Cuando se combinan niveles de varios factores para conformar un tratamiento, el experimentador se pregunta si es posible identificar los efectos de cada uno de los factores y eventualmente probar hipótesis sobre ellos. Los experimentos con arreglo factorial de tratamiento permiten responder a esa pregunta. A pesar de que otras estrategias podrían ser usadas, ¿por qué son preferibles los arreglos factoriales?. La respuesta está relacionada con el concepto de eficiencia, que, en términos prácticos, se relaciona con la cantidad de repeticiones que son necesarias en un

experimento para tener una precisión deseada para los contrastes de interés (Balzarini et al. 2008).

El diseño factorial tiene como objetivo principal estudiar los efectos que pueden tener varios factores sobre la variable respuesta. El hecho que los niveles de todos los factores varíen al mismo tiempo permite evaluar las interacciones entre los estos (Gutiérrez y Vara 2012). En este tipo de diseño se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores en cada réplica completa del experimento con el fin de determinar el efecto de un factor, es decir el cambio que se produce en la variable respuesta ante un cambio en un nivel del factor. Estos efectos pueden ser simples, principales y de interacción, sin importar la clase de efecto su cálculo e interpretación parte del concepto de medias (Kuehl 2001):

- Los efectos simples se entienden como las comparaciones entre los niveles de un factor a un solo nivel de otros. De tal forma, se identifica cuál de los niveles fue más efectivo ante la aplicación de una u otra técnica.

Ecuación (2): $A1 = \mu_{21} - \mu_{11}$

donde

$A1$: efecto simple del factor 1

μ_{11} : media de la interacción del nivel 1 del factor A y el nivel 1 del factor B

μ_{21} : media de la interacción del nivel 2 del factor A y el nivel 1 del factor B

- Los efectos principales hacen referencia a las comparaciones entre los niveles de un factor promediados para todos los niveles de otro factor, permitiendo determinar el cambio promedio de la variable respuesta, es pertinentes aclarar que esta técnica solo es aplicable ante factores con dos niveles.

Ecuación (3): $A1 = \mu_2 - \mu_1$

donde

$A1$: efecto principal del factor 1

μ_1 : media del nivel 1 del factor A

μ_2 : media del nivel 2 del factor A

- Los efectos de interacción miden las diferencias entre los efectos simples de un factor a diferentes niveles de otro.

Ecuación (4): $C1 = B1 - A1$

donde

$C1$: efecto de interacción entre el factor 1 y el factor 2

$A1$: efecto simple del factor 1

$B1$: efecto simple el factor 2

Las observaciones de un experimento factorial son representadas con un modelo lineal en el cual se relacionan los tratamientos y error experimental. A la vez, los tratamientos se encuentran compuestos por cada factor y su respectiva interacción:

Ecuación (5): $y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$

donde:

y_{ij} : variable respuesta para la observación i de acuerdo al tratamiento j

τ_j : efectos derivados de los tratamientos a la observación i

ε_{ij} : error experimental para la observación i y el tratamiento j

El modelo debe cumplir con los supuestos de normalidad, homogeneidad e independencia de los residuos.

4.2.2. Análisis de la varianza

El Análisis de la Varianza (ANOVA), permite probar hipótesis referidas a los parámetros de posición (esperanza) de dos o más distribuciones. La hipótesis que se somete a prueba generalmente se establece con respecto a las medias de las poblaciones en estudio o de cada uno de los tratamientos evaluados en un experimento (Hocking 1996).

El ANOVA es un procedimiento que descompone la variabilidad total en la muestra (suma de cuadrados total de las observaciones) en componentes (sumas de cuadrados) asociados cada uno a una fuente de variación reconocida (Nelder 1994). La técnica del Análisis de Varianza (ANOVA) permite realizar las estimaciones de las respuestas promedio de tratamientos y las comparaciones entre ellas.

El análisis de varianza es sensible a las propiedades estadísticas de los términos de error aleatorio del modelo lineal. Los supuestos tradicionales del ANOVA implican errores independientes, normalmente distribuidos y con varianzas homogéneas para todas las observaciones (Balzarini et al. 2008).

Según Di Rienzo et al. (2008) el análisis de varianza debe contemplar algunas consideraciones para su desarrollo:

- Los datos se comportan como normales y es útil para definir el efecto de las variables en el experimento.
- El p-valor es menor a 0,05 con un nivel de confianza del 95%, por ende, las variables tienen un efecto considerable en el modelo.
- Si algún factor no es significativo según éste análisis, la mejor opción es eliminarlo y analizar nuevamente el resultado del modelo.
- Si el factor no presenta un efecto considerable, pero su interacción sí, el factor debe ser incluido en el modelo. Por el contrario, si el factor tiene un efecto

relevante, pero sus interacciones no, dichas interacciones pueden ser eliminadas.

El objetivo del ANOVA es la comparación de las medias de la variable respuesta en esos grupos. El ANOVA examina la contribución relativa de diferentes fuentes de variación respecto a la variación total en la variable respuesta y permite contrastar la H_0 sobre igualdad de medias entre los grupos versus la H_1 que establece que al menos 1 es diferente.

Las variables involucradas en el ANOVA son la variable dependiente o respuesta, las variables de clasificación (predictoras asociadas a factores cualitativos o cuantitativos con un numero discreto de niveles) y las covariables (predictoras asociadas a fuentes de variación continuas entre UE) en caso de que existan. La variable dependiente es la variable sobre la cual se desea hacer comparaciones entre los tratamientos. Las variables de clasificación son las variables involucradas en el lado derecho de la ecuación del modelo estadístico del ANOVA y que representan factores o fuentes de variación que permiten separar o clasificar las observaciones en grupos.

El modelo de análisis de varianza para un experimento factorial con interacciones es como sigue:

Ecuación (6): $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ con $i = 1, 2; j = 1, 2; k = 1, \dots, n_{ij}$

Donde

Y_{ijk} representa la respuesta de la k -ésima repetición en el i -ésimo nivel del factor 1 y j -ésimo nivel de factor 2

μ representa una media general

α_i el efecto que produce el i -ésimo nivel del factor 1

β_j corresponde al efecto del j -ésimo nivel del factor 2

δ_{ij} el efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i del factor 1 y j del factor 2

ε_{ijk} es el error aleatorio asociado a la observación ijk -ésima.

Los términos ε_{ijk} que usualmente se suponen normal e independiente distribuidos con esperanza cero y varianza común σ^2 . Debe notarse que el subíndice k se mueve entre 1 y n_{ij} , es decir, el número de repeticiones para el tratamiento puede ser distinto. Asimismo, cada vez que se incluya un nuevo factor (factor n -ésimo) se generan interacciones de orden n -ésimo (primer orden, segundo, orden, entre otras).

Según Balzarini et al. (2008) al medir una variable sobre la misma unidad experimental en distintos momentos de tiempo se obtienen mediciones seriales que se caracterizan por estar correlacionadas ya que las mismas acarrean un mismo efecto de unidad experimental. El procedimiento de recolección de información

sobre la misma unidad produce una serie de medidas repetidas sobre cada unidad. Pueden existir o no otros factores que se reconozcan como fuentes de variabilidad entre las unidades o sujetos experimentales (between subject factor), pero siempre en este tipo de estudios se reconoce el factor tiempo como aquel con potencialidades de introducir variabilidad entre las observaciones registradas dentro de la misma unidad (within subject factor).

Di Rienzo et al. (2011) y Cayuela (2014) afirman que mediante el análisis de varianza (univariado), se podría ajustar un modelo de parcelas divididas a los datos de experimentos con mediciones repetidas. En dicho modelo el factor tratamiento se asocia a las unidades experimentales de mayor tamaño y el factor tiempo a las “subparcelas”. Los sujetos o unidades anidadas dentro del factor principal constituyen el término de error para el factor tratamiento. El análisis es apropiado sólo si las medidas no están correlacionadas en el tiempo (modelo esférico) o se puede sostener el supuesto de igual correlación entre cualquier par de mediciones repetidas sobre un mismo individuo (modelo de simetría compuesta “corCompSymm”) para las matrices de varianzas y covarianzas de las observaciones dentro de una misma unidad experimental.

Finalmente, si se rechaza la hipótesis nula del ANOVA, la pregunta que sigue es ¿cuál o cuáles de las medias poblacionales en estudio son las diferentes? Existe una gama muy amplia de alternativas para llevar adelante este tipo de pruebas, entre las que se destacan la de Tukey y la de Fisher (Balzarini et al. 2008).

4.2.3. Análisis de correlación

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las variables originales (Balzarini et al. 2011). Para las variables j-ésima y k-ésima se define como:

$$\text{Ecuación (7): } r_{jk} = \frac{S_{jk}}{\sqrt{S_j^2 S_k^2}} = \frac{\left(\sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ik} - \bar{x}_k) \right) / (n-1)}{\sqrt{\left(\left(\sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 \right) / (n-1) \right) \left(\left(\sum_{i=1}^n (x_{ik} - \bar{x}_k)^2 \right) / (n-1) \right)}}$$

donde S_{jk} es la covarianza entre la variable j y la variable k, S_j^2 y S_k^2 son las varianzas de las variables j y k respectivamente.

El coeficiente de correlación muestral representa la covarianza de los valores muestrales estandarizados. Asume valores en el intervalo [-1;1] y el signo indica la dirección de la asociación (valores negativos se producen cuando la tendencia

promedio indica que, si un valor en el par observado es más grande que su media, el otro valor es más pequeño que su media) (Di Rienzo et al. 2008).

4.2.4. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales y los gráficos conocidos como biplot son técnicas generalmente utilizadas para reducción de dimensión. Las técnicas de reducción de dimensión permiten examinar todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables. Con el ACP se construyen ejes artificiales (componentes principales) que permiten obtener gráficos de dispersión de observaciones y/o variables con propiedades óptimas para la interpretación de la variabilidad y covariabilidad subyacente. Los biplots permiten visualizar observaciones y variables en un mismo espacio, así es posible identificar asociaciones entre observaciones, entre variables y entre variables y observaciones (Balzarini et al. 2008).

Diferencias en los datos generan variabilidad, luego una forma de resumir y ordenar los datos es a través del análisis o la explicación de la estructura de varianza y covarianza del conjunto de variables en estudio.

El ACP es una técnica frecuentemente utilizada para ordenar y representar datos multivariados continuos a través de un conjunto de $d=1, \dots, p$ combinaciones lineales ortogonales normalizadas de las variables originales que explican la variabilidad existente en los datos de forma tal que ningún otro conjunto de combinaciones lineales de igual cardinalidad, tiene varianza de las combinaciones mayor a la del conjunto de componentes principales (Gabriel 1981). Usualmente se selecciona un número d mucho menor que p , para la representación de la variabilidad subyacente. Se espera que dicha reducción de dimensionalidad no produzca una pérdida importante de información. Desde este punto de vista, la técnica de reducción de la dimensión implica una consecuente ayuda en la interpretación de los datos. La primera componente contiene más información (sobre variabilidad) que la segunda, ésta a su vez más que la tercera y así sucesivamente hasta no explicar más variabilidad.

El ACP para ordenar observaciones se basa en la descomposición espectral de la matriz de covarianzas o de correlación entre variables de dimensión $p \times p$. La selección entre el estimador insesgado y el estimador máximo-verosímil de la matriz de covarianza poblacional es irrelevante, ya que produce las mismas componentes principales muestrales. Usando los autovectores de S o R como vectores de coeficientes para la combinación lineal se puede demostrar que las componentes principales son combinaciones lineales no correlacionadas cuyas varianzas son máximas.

La j-ésima componente principal (CPj) es algebraicamente una combinación lineal de las p variables originales obtenida como $Y_j = e_j' X = e_{1j} X_1 + e_{2j} X_2 + \dots + e_{pj} X_p$ con $j=1, \dots, p$ donde e_j representa el j-ésimo autovector. Las nuevas variables, CP, usan información contenida en cada una de las variables originales, algunas variables pueden contribuir más a la combinación lineal que otras. La varianza de la j-ésima componente principal es $\text{Var}(Y_j) = e_j' \Sigma e_j = \lambda_j$ donde el j-ésimo λ es el autovalor asociado al j-ésimo autovector de S, (los autovalores se ordenan en forma decreciente, $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 \dots$). Además, se satisface que, entre dos componentes cualesquiera, la covarianza es nula. La proporción de la varianza total explicada por las primeras dos componentes será:

Ecuación (8):
$$\text{Prop}_d = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_d}{\lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_p}$$

Los coeficientes de cada variable original estandarizados para una CP, permiten identificar las variables con mayor contribución en la explicación de la variabilidad entre observaciones en el eje asociado a la CP correspondiente.

5. MARCO METODOLÓGICO

5.1. Adecuación de las condiciones experimentales

El experimento se realizó en el cuarto climatizado del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi en Florencia, Caquetá (Colombia) (Figura 1). Se contó con 10 cubículos o cabinas para las inoculaciones (dimensiones de 1.3 m x 1.2 m x 2.5 m). La temperatura del aire se controló a 23 °C mediante el uso de dos aires acondicionados de 12000 Btu cada uno tipo mini split con filtro deshumificador. El control de la humedad relativa (90 - 95%) se manejó mediante un sistema de riego independiente por goteo. Finalmente, dentro de cada cubículo se manejó un fotoperíodo de 12/12 h mediante la adecuación de un temporizador y cuatro lámparas fluorescentes de 40 W (PAR= 11.5 μmol fotones. $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Mattos et al. 2003; Sterling et al. 2010).



Figura 1. Cuarto climatizado con cubículos para las inoculaciones controladas

5.2. Material vegetal

Se utilizaron los clones FX 4098 de alta productividad, vigoroso y moderadamente resistente a *M. ulei* (Mattos et al., 2005; Le Guen et al. 2008, Sterling et al. 2010; Rivano et al. 2010) y FX 3864 susceptible a *M. ulei* (Junqueira et al. 1988; Mattos et al. 2003; Sterling et al. 2009). Por cada clon de *H. brasiliensis* se emplearon plántulas de 4 meses de edad (dos pisos foliares) crecidas en bolsas de capacidad de 7 Kg, con suelo proveniente de la región del Caquetá (Departamento localizado entre las coordenadas 1° 37' 03" de latitud Norte y 75° 37' 03" de longitud Oeste (IGAC 2010), y mantenidas en casa de malla a temperatura promedio de 29.7 °C, humedad relativa media de 80.8% y radiación PAR promedio de 275 μmol fotones/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$.

5.3. Fuente de inóculo e inoculaciones controladas

Se empleó el aislamiento CVI2 de *M. ulei* perteneciente al banco de aislamientos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Sinchi en Florencia, Caquetá (Figura 2). El aislamiento fue conservado en medio de crecimiento (MC) (adaptado de Junqueira et al. 1984) en oscuridad a 24 °C y esporulado en medio M4 (papa dextrosa agar – PDA) (adaptado de Mattos 1999) con un fotoperíodo de 12/12 h.

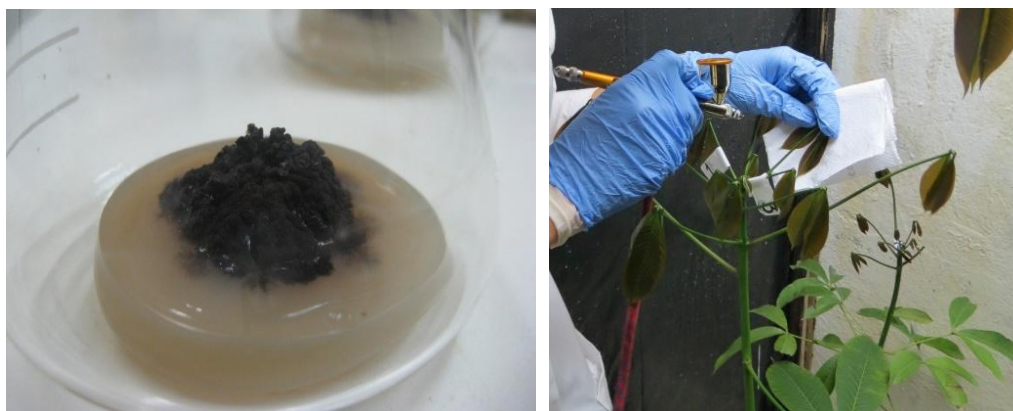


Figura 2. Fuente de inóculo de *M. ulei* (izquierda) y pruebas de inoculación controlada (derecha).

El inóculo primario, consistió en una suspensión de 2×10^5 conidios mL^{-1} (Mattos et al. 2003; Sterling et al. 2010) la cual se asperjó en el envés de 12 folíolos B2 (cuatro hojas trifoliadas; 10 días de edad) pertenecientes al segundo piso foliar de cada una de las cinco plantas empleadas por cada clon de caucho (FX 3864 y FX 4098) con la ayuda de un aerógrafo (Figura 2) acondicionado a un compresor eléctrico calibrado a 4.5 Pa de presión (Sterling et al. 2010).

Luego de la inoculación, las plantas permanecieron 24 horas en oscuridad y a partir de ahí hasta el día 20 se sometieron a un fotoperíodo de 12/12 h (radiación fotosintéticamente activa, PAR: $11.5 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a una temperatura de 23 °C y a una humedad relativa entre 90 y 95%.

5.4. Evaluación de la severidad de la enfermedad

La severidad del SALB (Fase conidial: *F. heveae*) se evaluó a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días después de la infección (DDI) a partir de la escala adaptada de Gasparotto et al. (1989) definida como el porcentaje de área foliar lesionada, valorada de 0 a 4: 0= nulo (0% de área foliar afectada); 1= bajo (0.2 - 5% del área foliar afectada); 2= medio (6 - 15% del área foliar afectada); 3= alto (18 - 30% del área foliar afectada); 4= muy alto (40 - 100% del área foliar afectada). Así mismo, se calculó el área bajo la curva de progreso del SALB por sus siglas en inglés AUSPC (Area Under the SALB Progress Curve) a través de la integración trapezoidal de la curva de progreso

de la severidad mediante la fórmula propuesta por Campbell y Madden (1990) (Ecuación 1).

5.5. Mediciones de intercambio gaseoso

Se midieron la tasa de asimilación neta de CO₂ (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la tasa de transpiración (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la conductancia estomática (g_s) ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) por medio de un equipo portátil de intercambio de gases IRGA de tipo abierto (TPS 2, PP Systems, USA) (Figura 3).



Figura 3. Mediciones de intercambio gaseoso utilizando el equipo portátil de intercambio de gases IRGA de tipo abierto (TPS 2, PP Systems, USA).

Así mismo se calculó el uso eficiente del agua (WUE) mediante la expresión:

Ecuación (9): $WUE = A/E$

que permitió determinar el balance entre la pérdida de agua y la toma de CO₂ (Bacon 2004).

El equipo se programó en condiciones de laboratorio a temperatura controlada (23 °C), humedad relativa saturante (90 - 95%), concentraciones de CO₂ (400 ppm) y densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) saturante ($1547 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Las evaluaciones en cada clon se realizaron en dos hojas trifoliadas (en el foliolo central de cada hoja) del segundo piso foliar en cada una de las cinco plantas empleadas en cada tratamiento (Inoculado I y No Inoculado NI) entre las 9:00 y las 11:00 am. Cada hoja fue etiquetada para realizar las medidas repetidas en el tiempo a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 DDI con el fin de cubrir el progreso de la fase infecciosa de la enfermedad.

5.6. Mediciones de fluorescencia de la clorofila a

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila a se estimaron inmediatamente después de las medidas de intercambio gaseoso mediante un fluorómetro portátil de pulso modulado (Hansatech, Hoddesdon, Inglaterra) (Figura 4).



Figura 4. Mediciones de fluorescencia de la clorofila a utilizando un fluorómetro portátil de pulso modulado (Hansatech, Hoddesdon, Inglaterra).

Las evaluaciones se realizaron en los mismos folíolos que se utilizaron para las mediciones de intercambio gaseoso. Previo al registro de los parámetros de fluorescencia, el punto de medición de cada folíolo se adaptó a la oscuridad durante 30 min. Una vez realizado este procedimiento, el tejido vegetal se expuso a un haz débil de luz modulada ($0.03 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para determinar la fluorescencia inicial (F_0). Luego un pulso de luz blanca saturante de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se aplicó por 1 s para asegurar la máxima emisión de fluorescencia (F_m), a partir de la cual se midió el parámetro $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, PSII).

Se midieron además bajo condiciones de luz actínica ($1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) los siguientes parámetros: eficiencia en la captura de la energía de excitación para los centros de reacción abiertos del PSII (F_v'/F_m'), los coeficientes de los quenching (apagamientos) fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ) y la tasa de transporte de electrones ETR.

La ETR se calculó con la fórmula:

$$\text{Ecuación (10): } \text{ETR} = \Phi\text{PSII} \times \text{PPFD} \times f \times \alpha$$

donde ΦPSII corresponde al rendimiento cuántico del PSII calculado con la fórmula: $(F_m' - F_s)/F_m'$; f es un factor que cuantifica la partición de energía entre PSII y PSI (fotosistema I) y se asume con un valor de 0.5, lo cual indica que la energía de excitación es distribuida equitativamente entre los dos fotosistemas; y α es la

absorbancia del tejido fotosintético de una hoja, cuyo valor se asume en 0.84 (Maxwell y Johnson 2000).

5.7. Diseño experimental

El experimento consistió en un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 2 x 2, donde el factor A corresponderá al clon (clon moderadamente resistente - FX 4098 y clon susceptible- FX 3864), el factor B al tratamiento (inoculado – I y No inoculado - NI) y la unidad experimental (repetición) cada una de las cinco plantas de caucho por cada combinación factorial.

5.8. Análisis estadísticos

- **Análisis de varianza de la evolución temporal de los síntomas del SALB y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad**

Se ajustó un modelo lineal general con análisis de la varianza para los factores: clon (FX 3864 y FX 4098), tiempo (4, 8, 12, 16 y 20 DDI) y su interacción (Anexo 1), así:

Ecuación (11): $Y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + \epsilon_{ijk}$

donde:

Y_{ijk}	variable respuesta (Severidad)
μ	media general
C_i	efecto del clon i, con $i = 1, 2$
T_j	efecto del tiempo j, con $j = 1, 2, 3, 4, 5$
$(CT)_{ij}$	Interacción clon x tiempo
ϵ_{ijk}	error residual de la planta k perteneciente al clon i en el tiempo j

Los supuestos del ANOVA se probaron gráficamente a partir de la independencia de los errores (residuals-plot), residuos normalmente distribuidos (QQ-Plot) y varianzas homogéneas para todas las observaciones (Fitted-plot). La correlación residual para las observaciones sucesivas realizadas sobre una misma planta se contempló mediante el modelo de simetría compuesta (corCompSymm) (Di Rienzo et al. 2011). El ajuste se realizó mediante la función lme de la librería nlme (Pinheiro et al. 2013) de R (R Core Team, 2017). El análisis de la interacción clon x tiempo para la comparación de medias se realizó mediante la prueba de comparaciones múltiples Tukey HSD ($\alpha = 0.05$) y gráficamente en R bajo la interfaz implementada en el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

Para la variable AUSPC se ajustó el modelo:

Ecuación (12): $Y_{ij} = \mu + C_i + \varepsilon_{ij}$

donde:

Y_{ij}	variable respuesta (AUSPC)
μ	media general
C_i	efecto del clon i , con $i = 1, 2$
ε_{ij}	error residual de la planta j perteneciente al clon i

Se probaron en R igualmente los supuestos del ANOVA y la comparación de medias con la prueba Tukey HSD gráficamente en R bajo la interfaz implementada en el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

- **Análisis de varianza de los cambios en el intercambio gaseoso y la fluorescencia de la clorofila a**

Se ajustó un modelo lineal general con los factores: clon (FX 3864 y FX 4098), tratamiento (I y NI), tiempo de muestreo (0, 4, 8, 12, 16 y 20 DDI) y sus interacciones (Anexo 2), así:

Ecuación (13):

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + T_j + TM_k + (C \times T)_{ij} + (C \times TM)_{ik} + (T \times TM)_{jk} + (C \times T \times TM)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijkl}	variable respuesta (A , E , gs , WUE , F_v/F_m , F'_v/F'_m , qP , NPQ , ETR)
μ	media general
C_i	efecto del clon i , con $i = 1, 2$
T_j	efecto del tratamiento j , con $j = 1, 2$
TM_k	efecto del tiempo de muestreo k , con $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$
$(C \times T)_{ij}$	Interacción clon x tratamiento
$(C \times TM)_{ik}$	Interacción clon x tiempo de muestreo
$(T \times TM)_{jk}$	Interacción tratamiento x tiempo de muestreo
$(C \times T \times TM)_{ijk}$	Interacción clon x tratamiento x tiempo de muestreo
ε_{ijkl}	error residual de la planta l perteneciente al clon i , del tratamiento j en el tiempo k

Los supuestos del ANOVA se probaron gráficamente (residuals-plot, QQ-Plot) y Fitted-plot). La correlación residual para las observaciones sucesivas realizadas sobre una misma planta se contempló también con el modelo de simetría compuesta. El ajuste se realizó igualmente con la función lme de la librería nlme (Pinheiro et al. 2013) de R (R Core Team, 2017). El análisis de los factores fijos y sus interacciones para la comparación de medias se realizó mediante la prueba de

comparaciones múltiples Tukey HSD ($\alpha = 0.05$) y gráficamente en R bajo la interfaz implementada en el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

- **Análisis de correlación y componentes principales para estudiar la relación entre el SALB y los parámetros fotosintéticos**

Con el fin de analizar el grado de asociación entre la severidad y las variables fisiológicas (Anexo 3), se empleó: a) análisis de correlación (Prueba de Pearson) entre las distintas variables para los estadios foliares B (10 – 18 días de edad) y C (19 – 30 días de edad) en las plantas inoculadas del clon susceptible (FX 3864), debido a que éste material presentó los mayores niveles de severidad de la enfermedad; b) análisis de componentes principales sobre la matriz de correlaciones con gráfico biplot para explorar las relaciones multivariadas entre las variables estudiadas y los clones de caucho en combinación con los tratamientos empleados. Los análisis se realizaron en RStudio Versión 1.0.143 para R versión 3.4.1 (R Core Team, 2017) y gráficamente el biplot en R bajo la interfaz implementada en el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

6. ANÁLISIS Y RESULTADOS

6.1. Severidad de los síntomas del SALB y AUSPC

El análisis de los supuestos del anova sobre los residuos del modelo lineal general para la severidad del SALB y el AUSPC demostró una independencia de los residuos, una aproximación hacia una distribución normal (Gaussiana), y una mínima heterocedasticidad en el caso de la severidad (ausencia de patrones en la dispersión de los residuos), y una baja homocedasticidad en el caso del AUSPC (Figura 5).

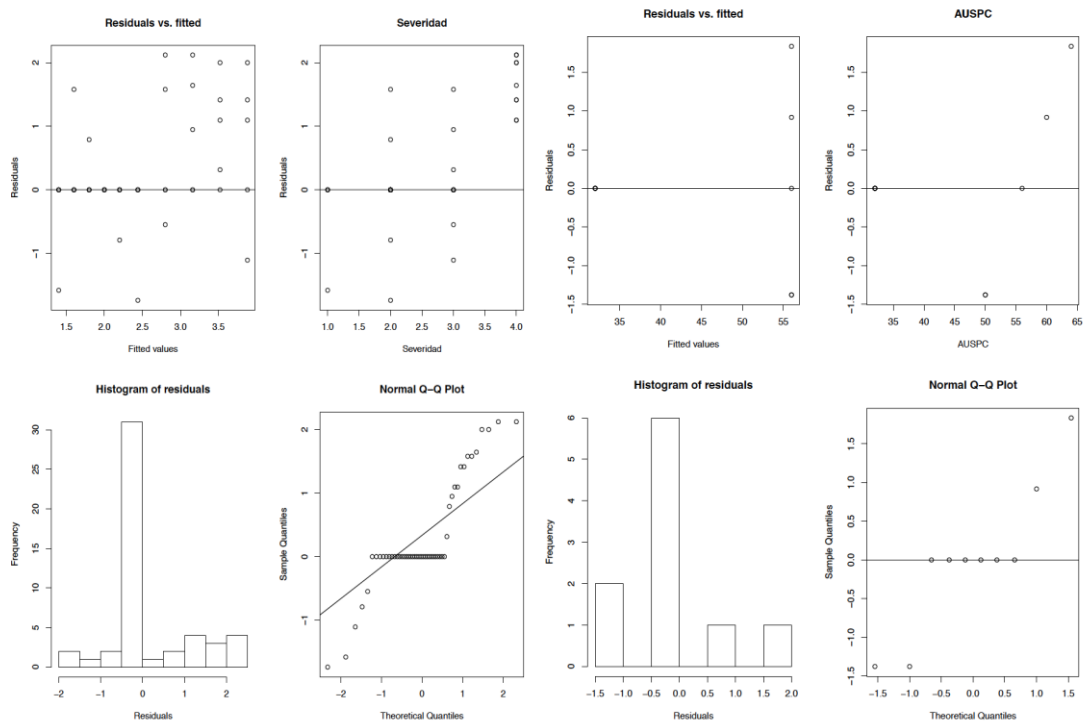


Figura 5. Validación gráfica para los supuestos estadísticos del anova para las variables severidad del SALB (izquierda) y AUSPC (derecha).

La prueba de hipótesis realizada sobre la severidad del SALB y el AUSPC mostró evidencia que permite rechazar la hipótesis nula, por lo que se concluye que existen diferencias significativas en el valor promedio de la severidad y en la media del AUSPC (ambas, $p < 0.05$) entre clones, y en el caso de la severidad a través del tiempo (progreso de la enfermedad) y en la interacción clon x tiempo, es decir, que las diferencias encontradas entre las medias de severidad entre clones no son las

mimas entre distintos rangos de tiempo del progreso de la enfermedad (Tabla 1 y Figura 6). En este sentido, se encontró un valor medio de severidad de 2.48 el cual osciló entre 1.00 (ataque bajo) para el clon FX 4098 en el día 4 después de la inoculación y 3.60 (ataque alto a muy alto) en el clon FX 3864 a partir del día 16 después de la inoculación (Figura 6A).

La severidad del SALB en el clon FX 3864 fue significativamente superior a través del tiempo respecto a lo observado en el clon FX 4098 ($p < 0.05$), donde la diferencia fue mayor a partir de los 12 DDI. La severidad en el clon más susceptible (FX 3864) se estabilizó a partir del día 12 después de la inoculación, mientras que en el clon FX 4098 ocurrió a partir del día 8 en donde se observó la mayor severidad (2,00).

El AUSPC en el clon FX 3864 tuvo un valor promedio de $56 \pm 1,95$, es decir, una media 42.8 % significativamente superior al calculado en el clon FX 4098 ($56 \pm 1,95$) ($p < 0.01$) (Figura 6b). Las plantas no inoculadas (NI) de ambos clones no mostraron evidencia de la infección y, por tanto, se utilizaron como plantas control.

Tabla 1. Análisis de varianza de los efectos clon (C), tratamiento (T), tiempo de muestreo (TM), y sus interacciones, para severidad, área bajo la curva de progreso del SALB (AUSPC), tasa de asimilación neta de CO_2 (A), conductancia estomática a vapor de agua (g_s), tasa de transpiración (E), uso eficiente del agua extrínseco (WUE_e), rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m), eficiencia en la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del PSII (F_v'/F_m'), coeficientes de los quenching fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ) y tasa de transporte de electrones (ETR).

Variables	p - valores basados en el estadístico de Fisher (F)						
	C	T	TM	C x T	C x TM	T x TM	C x T x TM
Severidad	<0.001	-	<0.001	-	0.031	-	-
AUSPC	<0.001	-	-	-	-	-	-
A	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
g_s	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
E	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
WUE_e	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
F_v/F_m	0.021	<0.001	0.001	0.008	0.419	<0.001	0.005
F_v'/F_m'	0.535	0.004	<0.001	0.601	0.003	0.004	0.024
qP	0.003	0.191	<0.001	0.874	<0.001	0.031	0.007
NPQ	0.730	0.466	0.053	0.616	0.179	0.135	0.317
ETR	0.001	0.115	<0.001	0.946	<0.001	0.014	0.470

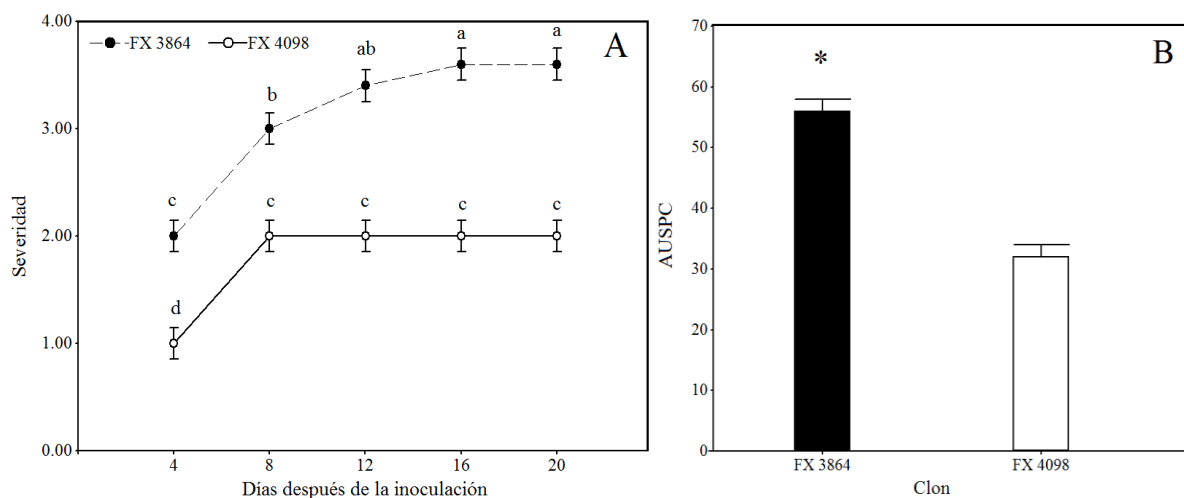


Figura 6. Curva de progreso de la severidad del SALB (fase conidial: *Fusicladium heveae*) (a) y área bajo la curva de progreso del SALB (AUSPC) (b), para dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) en condiciones de inoculación controlada. $4 \leq \text{DDI} \leq 8$, folíolos B (14 -18 días de edad). $8 < \text{DDI} \leq 20$, folíolos C (19 – 30 días de edad). Medias para FX 3864 (susceptible) y FX 4098 (moderadamente resistente) seguidas por letras distintas para cada evaluación en el tiempo o por un asterisco, fueron significativamente diferentes (Prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media; $n = 5$

6.2. Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila a

El análisis gráfico de los supuestos del anova sobre los residuos del modelo lineal general para las variables de intercambio gaseoso y de fluorescencia de la clorofila a demostró independencia de los residuos (ausencia de correlación residual), una distribución normal (Gaussiana), y ausencia de patrones en la dispersión de los residuos versus los valores predichos por el modelo, es decir, se cumple el supuesto de homogeneidad de las varianzas para todas las variables estudiadas (Figuras 7 y 8).

La prueba de hipótesis sobre los efectos principales del modelo mostró evidencia para rechazar en todos los casos la hipótesis nula, por lo que se encontraron diferencias significativas en A , g_s , E y WUE entre los dos clones de caucho, entre los tratamientos (I y NI) y a través del tiempo (DDI). Asimismo, resultaron muy significativas todas las interacciones entre estos factores (Tabla 1 y anexo 4). Para el clon FX 4098 (moderadamente resistente) se encontraron diferencias significativas en A entre plantas inoculadas (I) y plantas no inoculadas (NI) a los 8 DDI (Figura 9a) y a los 8, 16 y 20 DDI para el clon FX 3864 (susceptible) (Figura 9b).

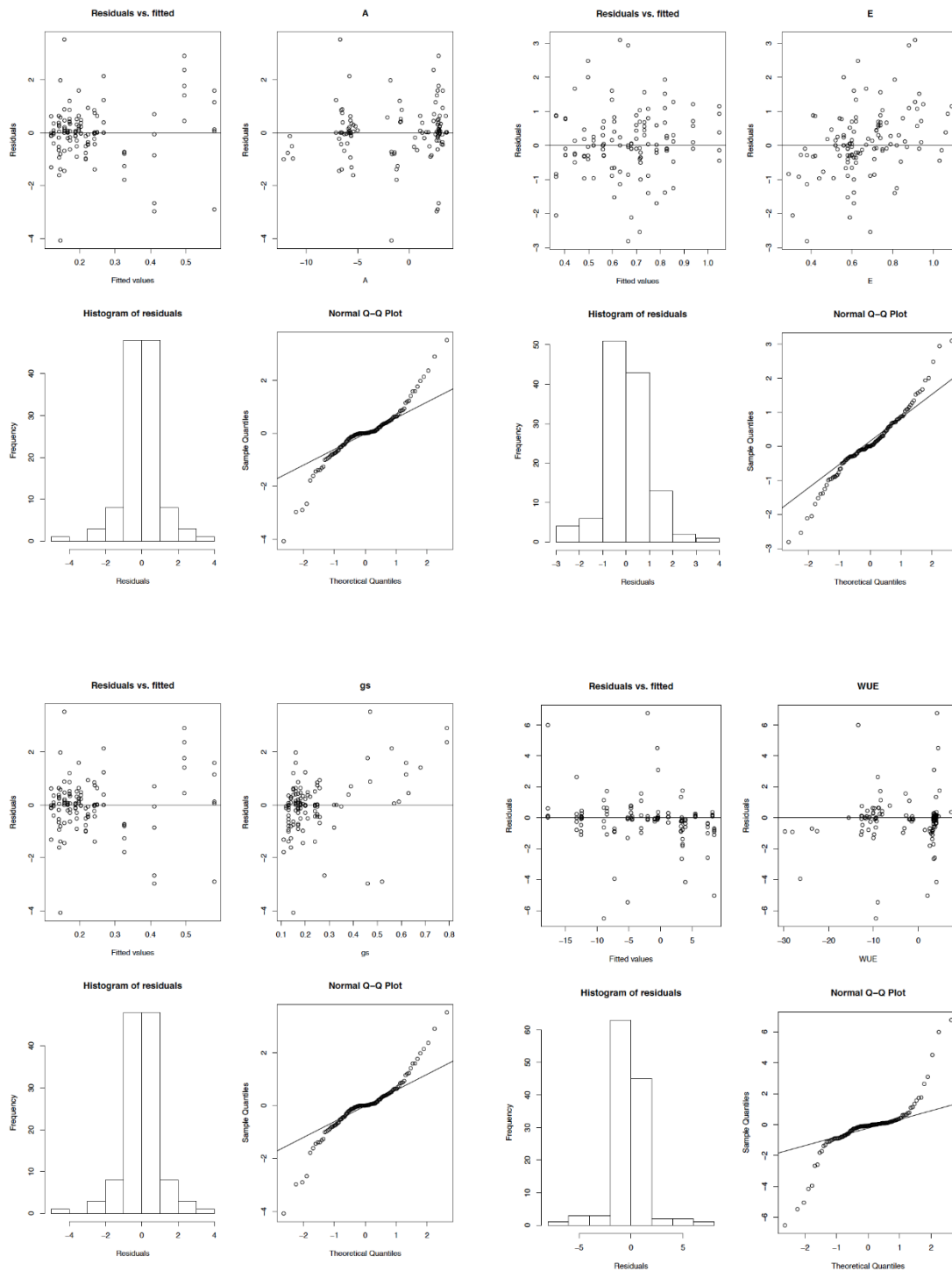


Figura 7. Validación gráfica para los supuestos estadísticos del anova para las variables de intercambio gaseoso: tasa de asimilación neta (A), tasa transpiratoria (E), conductancia estomática (g_s) y uso eficiente del agua (WUE)

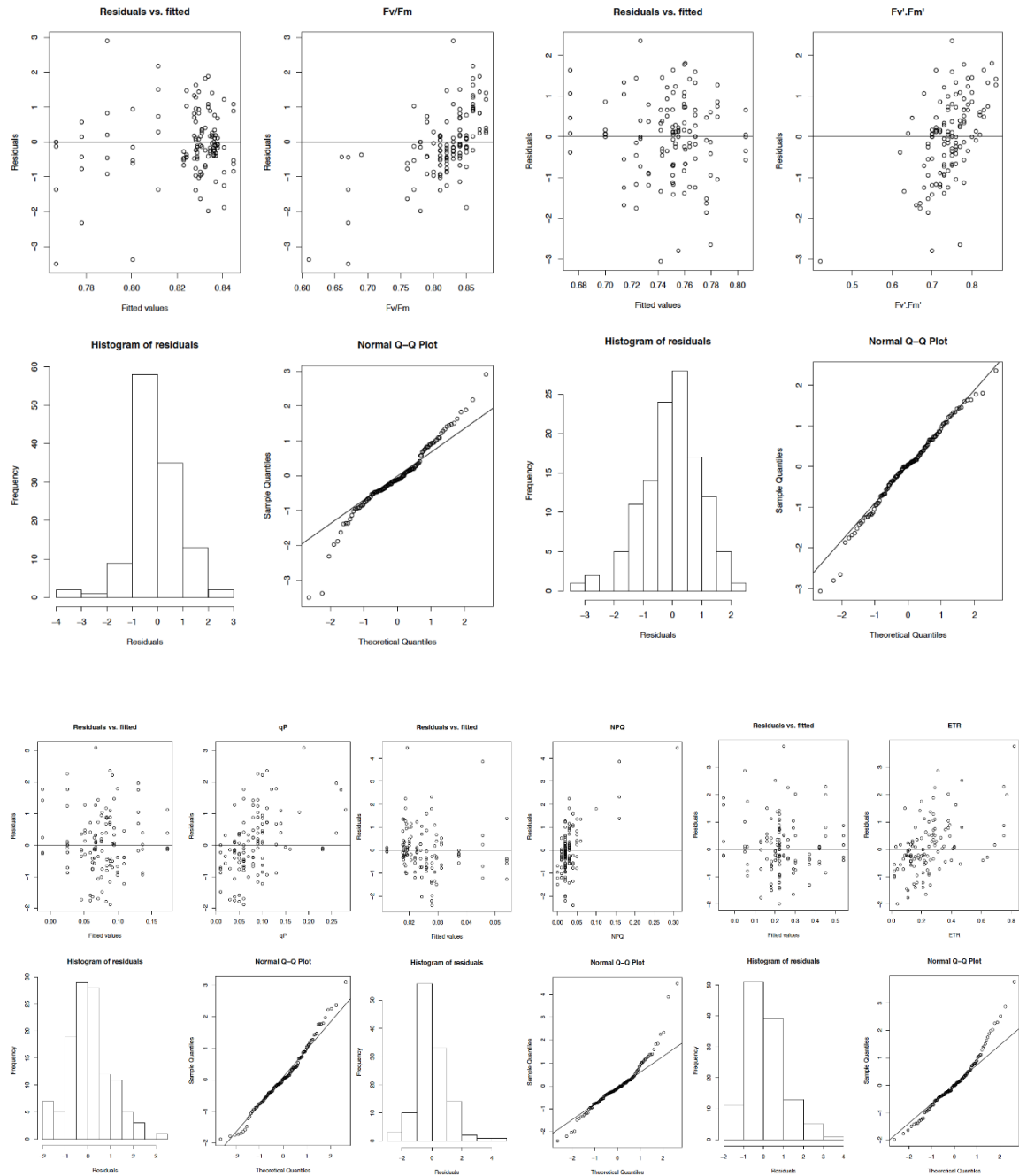


Figura 8. Validación gráfica para los supuestos estadísticos del anova para las variables de la fluorescencia de la clorofila *a*: rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m); eficiencia en la captura de la energía de excitación para los centros de reacción abiertos del PSII (F_v'/F_m'); quenching fotoquímico (q_p); quenching no fotoquímico (NPQ); tasa de transporte de electrones (ETR)

En el clon FX 4098 la mayor afectación de *A* ocurrió en el estadio foliar B, a los 8 DDI en las plantas inoculadas, con una reducción del 45.2% en comparación con

las plantas no inoculadas, diferente a lo observado en el estadio foliar C (≥ 12 DDI) donde no hubo una reducción significativa de A . Para el clon FX 3864, la disminución de A fue del 88.3% a los 8 DDI (estadio B) y del 70.6% a los 20 DDI (estadio C) en plantas inoculadas frente a las no inoculadas.

Similar a lo registrado en A , las mayores reducciones en WUE se presentaron en ambos clones a los 8 DDI (71.1% en FX 4098, y 93.5% en FX 3864) (Figura 9g, h, respectivamente). En las plantas inoculadas del clon FX 3864, el más afectado por el SALB ($< A$), se observó que los parámetros g_s y E fueron significativamente inferiores en un 74.6% a los 16 DDI y 58.8% a los 20 DDI, respectivamente, en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 9d, f).

Se encontraron diferencias significativas entre los clones FX 4098 y FX 3864 desde los 4 hasta los 20 DDI para A y para g_s (excepto a los 8 DDI) (Figura 6a-d), y a los 12 y 16 DDI para E (Figura 9e, f). Entre los 12 y 16 DDI no se observaron diferencias significativas en el valor medio de WUE entre los dos clones (Figura 9g, h).

En el clon moderadamente resistente (FX 4098) se observó un efecto significativo del tratamiento (I y NI) sobre los parámetros F_v/F_m , F_v'/F_m' y qP a los 20 DDI, y a los 16 DDI para qP (en todos los casos, en el estadio foliar C) (Figura 10a, c, e). En este sentido, los valores medios de F_v/F_m , F_v'/F_m' , y qP decrecieron significativamente en 5.8, 5.2 y 20.8% respectivamente en plantas inoculadas respecto a las plantas no inoculadas al final del seguimiento (20 DDI). Asimismo, hubo una reducción del 30.7% en la media de qP de plantas inoculadas frente a las no inoculadas a los 16 DDI. No se presentaron diferencias significativas entre inoculadas y no inoculadas para los parámetros NPQ y ETR (Figura 10g, i).

Se encontraron diferencias significativas en F_v/F_m , F_v'/F_m' , qP y ETR en al menos uno de los factores (clon, tratamiento y DDI) al igual que en algunas de las interacciones entre estos factores (Tabla 1). No hubo un efecto significativo de estos factores ni de sus interacciones en el valor medio de NPQ. En el clon susceptible (FX 3864), los valores medios de F_v/F_m decrecieron significativamente en 9.5, 9.6 y 11.9% en plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas a los 8, 16 y 20 DDI, respectivamente (Figura 10b). Asimismo, F_v'/F_m' descendió significativamente en 12.2 y 6.7% en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas a los 8 y 20 DDI, respectivamente (Figura 10d). No se observó un efecto significativo del tratamiento (I y NI) sobre los parámetros qP , NPQ y ETR (Figura 10f, h, j).

No se encontraron diferencias significativas para F_v/F_m entre los clones FX 4098 y FX 3864 (Figura 10a, b). Hubo diferencias significativas para la media de F_v'/F_m' entre ambos clones a los 12 DDI, con valores superiores en el FX 4098 (Figura 10c, d). Para qP y ETR estas diferencias entre clones ocurrieron a los 0, 4 y 20 DDI (Figura 10e, f, i, j). Asimismo, se presentaron diferencias significativas para qP a los 16 DDI.

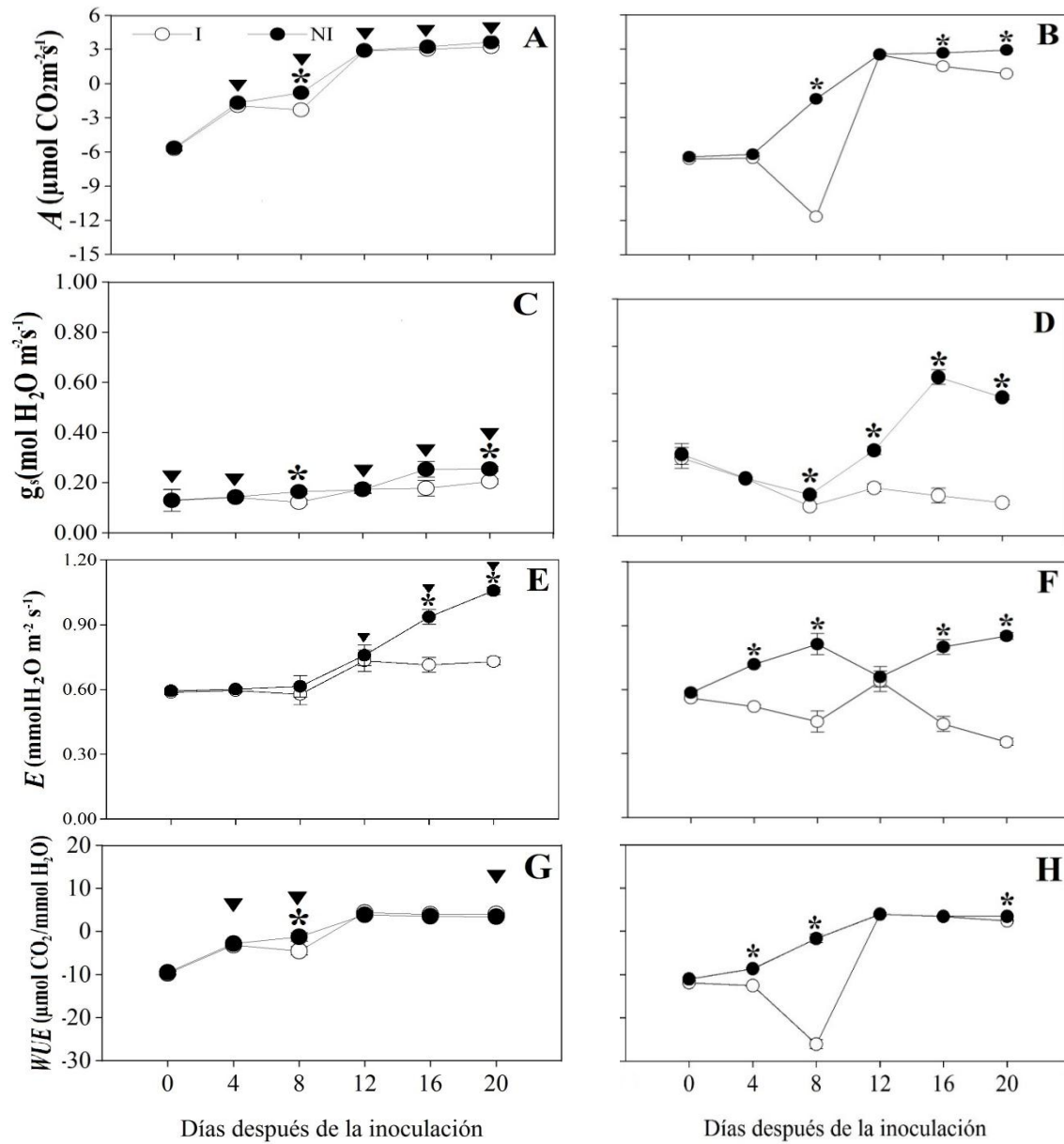


Figura 9. Tasa de asimilación neta de CO₂ (A) (a, b); conductancia estomática a vapor de agua (g_s) (c, d); tasa de transpiración (E) (e, f); y uso eficiente del agua (WUE) (g, h) para folíolos de plantas de caucho (*Hevea brasiliensis*) de los clones FX 4098 (moderadamente resistente) (a, c, e, g) y FX 3864 (susceptible) (b, d, f, h), inoculados (I) y no inoculados (NI) con *Microcyclus ulei* (fase conidial: *Fusicladium heveae*) en condiciones controladas. $4 \leq \text{DDI} \leq 8$, folíolos B (14 -18 días de edad). $8 < \text{DDI} \leq 20$, folíolos C (19 – 30 días de edad). Medias para los clones FX 4098 y FX 3864 seguidos por un triángulo invertido y para los tratamientos I y NI seguidos por un asterisco (*) para cada evaluación en el tiempo fueron significativamente diferentes (Prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media; $n = 5$.

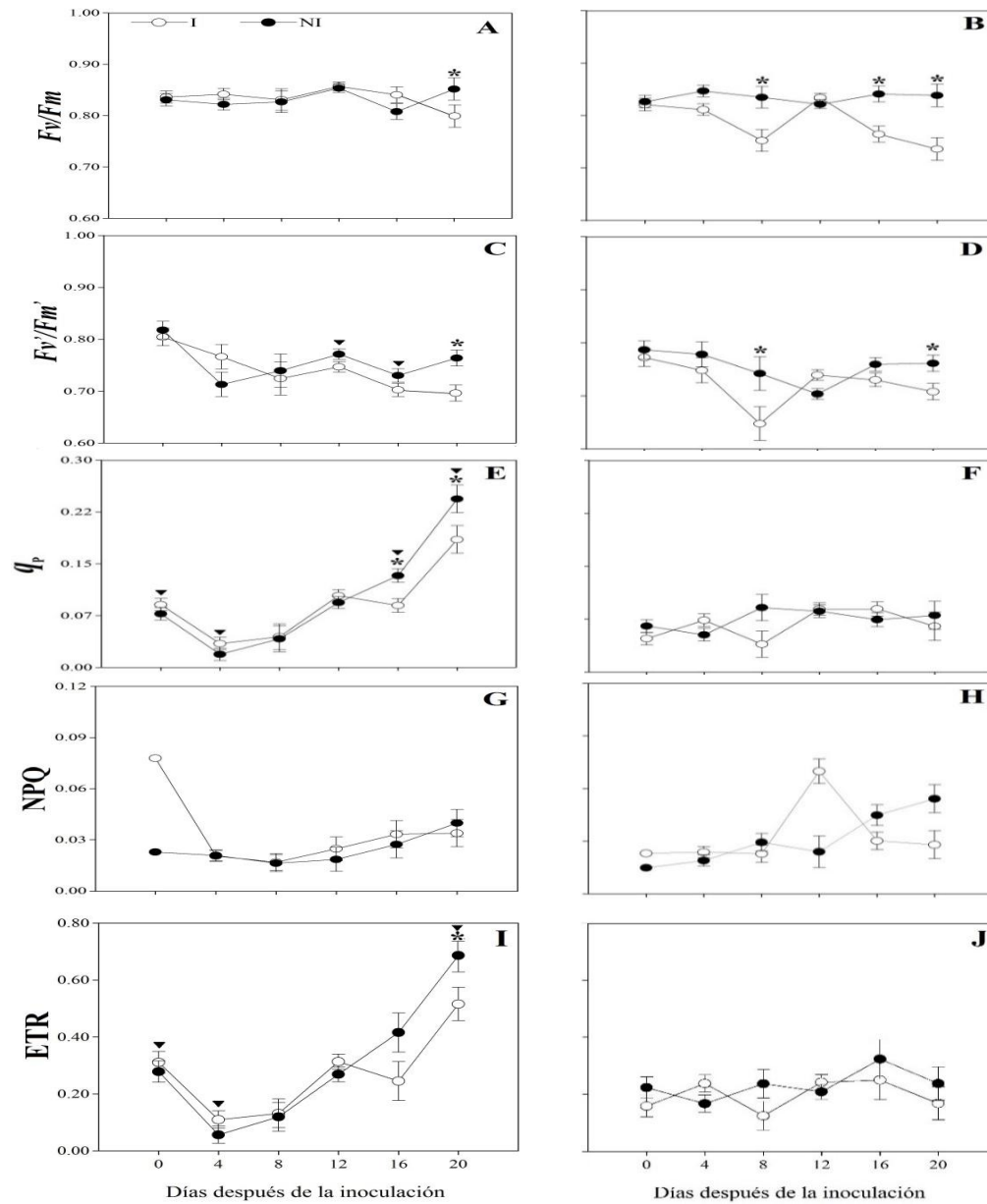


Figura 10. Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m) (a, b); eficiencia en la captura de la energía de excitación para los centros de reacción abiertos del PSII (F_v'/F_m') (c, d); quenching fotoquímico (q_p) (e, f); quenching no fotoquímico (NPQ) (g, h); tasa de transporte de electrones (ETR) (i, j) para folíolos de plantas de caucho (*Hevea brasiliensis*) de los clones FX 4098 (parcialmente resistente) (a, c, e, g, i) y FX 3864 (susceptible) (b, d, f, h, j), inoculados (I) y no inoculados (NI) con *Microcylus ulei* (Fase conidial: *Fusicladium heveae*) en condiciones controladas. $4 \leq \text{DDI} \leq 8$, folíolos B (14 -18 días de edad). $8 < \text{DDI} \leq 20$, folíolos C (19 – 30 días de edad). Medias para los clones FX 4098 y FX 3864 seguidos por un triángulo invertido y para los tratamientos I y NI seguidos por un asterisco (*) para cada evaluación en el tiempo fueron significativamente diferentes (Prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media; $n = 5$.

6.3. Relación entre los síntomas del SALB y los parámetros fotosintéticos

El análisis de correlación de Pearson realizado en las plantas inoculadas del clon susceptible (FX 3864) (material genético que presentó las mayores notas de severidad del SALB y la mayor alteración fisiológica), mostró una correlación positiva de A con g_s , E y WUE en ambos estadios foliares (Tabla 2). Asimismo, se observó en ambos estados fenológicos una correlación negativa de la severidad del SALB con todos los parámetros de intercambio gaseoso, en donde la correlación de la severidad con WUE en el estadio foliar C fue la única no significativa.

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson para el estadio foliar B (10 -18 días de edad) (arriba de la diagonal) y el estadio foliar C (19 -30 días de edad) (abajo de la diagonal), entre la severidad del SALB, A , g_s , E y WUE medidos en plantas de caucho (*Hevea brasiliensis*) del clon FX 3864 (susceptible) inoculadas con *Microcyclus ulei* (Fase conidial: *Fusicladium heveae*).

Parámetros	A	g_s	E	WUE	Severidad
A	...	0.60**	0.86**	0.98**	-0.76**
g_s	0.94**	...	0.73**	0.62**	-0.63**
E	0.95**	0.86**	...	0.92**	-0.87**
WUE	0.87**	0.85**	0.70**	...	-0.80**
Severidad	-0.54*	-0.58*	-0.58*	-0.38ns	...

A , Tasa de asimilación neta de CO_2 ; g_s , conductancia estomática a vapor de agua; E , tasa de transpiración; uso eficiente del agua extrínseco, WUE

* $p < 0.05$; significativo; ** $p < 0.01$, muy significativo; ns, no significativo

En relación con los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a , se observaron correlaciones positivas significativas de F_v/F_m con qP , NPQ y ETR en el estadio foliar B (10 - 18 días), mientras que en el estadio foliar C (19 – 30 días) sólo se presentaron correlaciones positivas significativas de F_v/F_m con F_v'/F_m' y ETR (Tabla 3). F_v/F_m fue el único parámetro que se correlacionó negativamente con la severidad en ambos estadios foliares.

El análisis de componentes principales (ACP) realizado sobre la matriz de correlación de las 10 variables estudiadas, explicó el 95% de la variabilidad con los dos primeros componentes, los cuales presentaron raíces características mayores a la unidad (Tabla 4 y Figura 11).

Al analizar los coeficientes de los vectores característicos asociados a los dos primeros componentes principales, se concluyó que las variables de mayor importancia en su orden fueron: A , WUE , E , severidad, F_v/F_m , F_v'/F_m' y g_s (Tabla 5).

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson para el estadio foliar B (10 -18 días de edad) (arriba de la diagonal) y el estadio foliar C (19 -30 días de edad) (abajo de la diagonal), entre la severidad del SALB, F_v/F_m , F_v'/F_m' , qP , NPQ y ETR medidos en plantas de caucho (*Hevea brasiliensis*) del clon FX 3864 (susceptible) inoculadas con *Microcyclus ulei* (Fase conidial: *Fusicladium heveae*).

Parámetros	F_v/F_m	F_v'/F_m'	qP	NPQ	ETR	Severidad
F_v/F_m	...	0.87**	0.48ns	0.11ns	0.51*	-0.57*
F_v'/F_m'	0.35ns	...	0.57*	0.34ns	0.60*	-0.61*
qP	0.50*	0.11ns	...	0.52*	0.99**	-0.09ns
NPQ	0.59*	0.26ns	0.11ns	...	0.53*	-0.01ns
ETR	0.53*	0.24ns	0.96**	0.20ns	...	-0.12ns
Severidad	-0.58*	-0.38ns	-0.34ns	-0.57*	-0.37ns	...

F_v/F_m , rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII); F_v'/F_m' , eficiencia en la captura de la energía de excitación por los centros abiertos del PSII; qP y NPQ, coeficientes de los quenching fotoquímicos y no fotoquímicos, respectivamente; ETR, tasa de transporte de electrones.

*p < 0.05; significativo; **p < 0.01, muy significativo; ns, no significativo

Tabla 4. Autovalores y proporción de la variabilidad capturada mediante un análisis de componentes principales

Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum
1	7,537	0,754	0,754
2	1,984	0,198	0,952
3	0,479	0,048	1,000
4	0,000	0,000	1,000
5	0,000	0,000	1,000
6	0,000	0,000	1,000
7	0,000	0,000	1,000
8	0,000	0,000	1,000
9	0,000	0,000	1,000
10	0,000	0,000	1,000

El primer componente principal (CP1) explicó el 75,4% de la variabilidad y separó en primera instancia el clon FX 3864 inoculado (con la mayor severidad del SALB y NPQ) del FX 4098 no inoculado que presentó los mayores valores para todos los parámetros fotosintéticos con excepción de g_s y NPQ (Tabla 6 y Figura 12). El segundo componente principal (CP2) explicó el 19,8% de la variabilidad y separó el FX 3864 no inoculado con la mayor conductancia estomática del FX 4098 inoculado con el mejor valor para esta variable.

Tabla 5. Coeficientes de los vectores característicos asociados a los dos primeros componentes principales

Variables	e1	e2
Severidad	-0,346	-0,220
E	0,358	0,104
gs	0,059	0,700
A	0,362	-0,071
WUE	0,362	0,016
Fv/Fm	0,343	0,140
NPQ	-0,292	0,096
ETR	0,307	-0,375
qP	0,278	-0,456
Fv'/Fm'	0,335	0,261

Tabla 6. Coeficientes de correlación de las variables originales con las dos primeras componentes principales

Variables	CP 1	CP 2
Severidad	-0,950	-0,310
E	0,982	0,147
gs	0,161	0,987
A	0,995	-0,100
WUE	0,994	0,022
Fv/Fm	0,941	0,197
NPQ	-0,802	0,135
ETR	0,843	-0,528
qP	0,763	-0,642
Fv'/Fm'	0,918	0,368

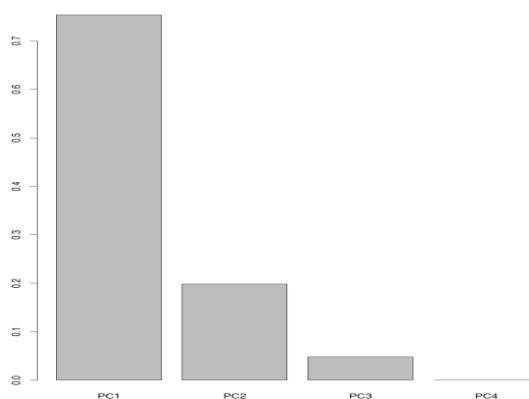


Figura 11. Porcentaje de variabilidad capturada con las primeras cuatro componentes de un análisis de componentes principales realizado sobre la matriz de correlaciones de 10 variables (severidad y nueve fisiológicas) en relación con la combinación clon – tratamiento

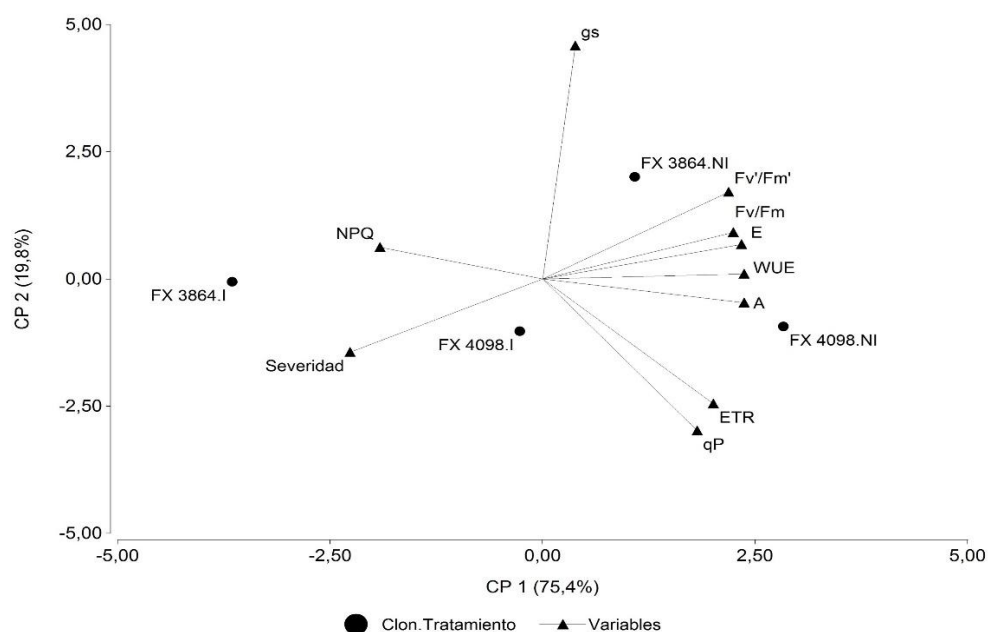


Figura 12. Análisis de componentes principales (gráfico biplot) con 10 variables (una fitosanitaria y nueve fisiológicas) en relación con la combinación clon – tratamiento. Clave: tasa de asimilación neta de CO_2 (A), conductancia estomática a vapor de agua (gs), tasa de transpiración (E), uso eficiente del agua (WUE), rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (Fv/Fm), eficiencia en la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del PSII (Fv'/Fm'), coeficientes de los quenching fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ) y tasa de transporte de electrones (ETR).

En general, en el clon inoculado FX 3864 se observó la mayor severidad y quenching no fotoquímico (mayor disipación por calor) y la mayor afectación fotosintética (menor valor para los restantes parámetros fotosintéticos analizados), mientras que en el FX 4098 inoculado la afectación fue mínima, asociada a un leve aumento en el NPQ .

Los resultados mostraron que los parámetros de intercambio gaseoso y la fluorescencia de la clorofila a fueron poco afectados en el clon moderadamente resistente (FX 4098) después de la inoculación con *F. heveae* (fase conidial de *M. ulei*). Este comportamiento es afín con el buen comportamiento ecofisiológico que ha expresado este material en condiciones de campo (Sterling et al. 2015). En contraste, en el clon susceptible (FX 3864) los parámetros de intercambio gaseoso fueron fuertemente afectados por la infección de *M. ulei*; similar a lo reportado para otras especies (Aucique-Pérez et al. 2014). En general, se observó que a medida que la severidad del SALB se incrementó en el tiempo, el desempeño fotosintético decreció significativamente, pero este efecto fue menos evidente en el clon con menor susceptibilidad al SALB (FX 4098).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La intensidad de los síntomas del SALB varió significativamente a través del tiempo y estos cambios estuvieron más influenciados por el mayor nivel de susceptibilidad a *M. ulei* presentado por el clon FX 3864 en donde se presentó al final del ciclo infeccioso la mayor media de AUSPC.
- Las tasas fotosintéticas en el clon FX 3864 (susceptible) fueron significativamente reducidas en respuesta a la infección por *M. ulei*, y en un mínimo grado en el clon FX 4098 (moderadamente resistente), como resultado de una menor conductancia estomática y en el uso eficiente del agua en el clon susceptible.
- Existe una diferenciación significativa en la habilidad para capturar, usar y disipar la energía lumínica por parte del aparato fotosintético (fotosistema II) entre los clones de *H. brasiliensis* FX 3864 y FX 4098, lo cual se evidenció en la fotosíntesis del clon susceptible (FX 3864).
- La afectación de la fotosíntesis fue proporcional al progreso y a la intensidad de los síntomas de la enfermedad, y el fenómeno estuvo principalmente correlacionado con las variables A , E , g_s , F_v/F_m y NPQ y asociado principalmente al clon FX 3864 que fue el más afectado fisiológicamente.
- Se sugiere analizar con técnicas estadísticas exploratorias, de clasificación e inferenciales la respuesta en campo de los dos clones caucho a nivel de dosel teniendo en cuenta el estado fenológico y la densidad foliar, como una herramienta para asistir los programas de mejoramiento genético que buscan resistencia durable a *M. ulei*.
- Se recomienda probar índices epidemiológicos y tablas de contingencia de caso y control para analizar la incidencia del SALB comparativamente entre clones resistentes y susceptibles y plantas inoculadas y no inoculadas con *M. ulei*.

8. LISTA DE REFERENCIAS

Agrios, GN (2005) Fitopatología. Edit. LIMUSA S.A. México. 838 p.

ASOHECA (Asociación de Reforestadores y Cultivadores de Caucho del Caquetá, CO) (2015) Información estadística de caucho en el Departamento del Caquetá (Colombia).

Aucique Perez CE, Rodríguez FA, Moreira WR, DaMatta FM (2014) Leaf Gas Exchange and Chlorophyll a Fluorescence in Wheat Plants Supplied with Silicon and Infected with *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 104(2):143-149

Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, DaMatta FM, Alfenas AC (2011) Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiol Plant* 33:1831-1839

Azcón-Bieto, J, Talón, M (2000) Fundamentos de la fisiología vegetal. Madrid

Bacon M (2004) Water use efficiency in plant biology. Blackwell Publishing Ltd. Oxford UK, p 322

Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., Robledo C.W. (2008). Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina

Balzarini M, Di Rienzo J, Tablada M; Gonzalez, L Bruno C, Córdoba M, Robledo W; Casanoves F (2011) Introducción a la bioestadística. Primera edición. Universidad Nacional de Córdoba. 400 p.

Bassanezi RB, Amorim L, Filho AB, Berger RD (2003) Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *J Phytopathol* 150:37-47

Berger S, Sinha AK, Roitsch T (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen inter-actions. *J Exp Bot* 58:4019-4026

Bermudez-Cardona MB, Wordell FJA, Ávila RF (2015) Leaf gas Exchange and chlrophyll a fluorescence in maize leaves infected with *Stenocarpella macrospora*. *The American Phytopathological Society* 105(1):26-34

Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berge S (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in Arabidopsis leaves. *Planta* 225:1-12

Campbell CL, Madden LV (1990) *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York

Cardoso SEA, Freitas TA, Silva D da C, Gouvea LRL, Goncalves P, Mattos CRR, García D (2014) Comparison of growth, yield and related traits of resistant Hevea genotypes under high South American leaf blight pressure Brasil. *Industrial Crops and Products* 53:337-349

Castro, NOM (2011) Caracterización de los patosistemas foliares de importancia económica en caucho (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg) en la Altillanura estructural plana del Meta (Colombia). 58 p.

Cayuela, L (2014) Modelos lineales mixtos (LMM) y modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) en R (versión 3.0). 66p.

Chee KH, Holliday P (1986) South American leaf blight of Hevea Rubber. Malaysian Rubber Research and Development Board Board Monograph, p 50

Compagnon, P (1998) El caucho natural, biología - cultivo - producción. Consejo Mexicano del Hule – CIRAD. México, D. F. 701 p.

CCC (Confederación Cauchera Colombiana, CO) (2015) Estado actual del gremio cauchero colombiano. En: Memorias Congreso Internacional Cauchero 2015.CCC/SENA/SAC/Gobernación del Meta/Cámara de Comercio de Villavicencio. Villavicencio-Meta. 15p.

Di Rienzo, J.A, Casanoves, F, Gonzalez, Laura A,Tablada, EM, Díaz, MP, Robledo, CW; Balzarini, M (2008) Estadística para las Ciencias Agropecuarias. Séptima Edición. 373 p.

Di Rienzo JA, Macchiavelli RE, Casanoves F (2011) Modelos lineales mixtos: aplicaciones en InfoStat. 1ª ed. Grupo Infostat. Córdoba, Argentina, p 248

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión (2017) Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Eriksson, OE, Hawksworth, DL (1993) Outline of the Ascomycetes-1993. System Ascomycetum. 12: 51-257.

Furtado EL, Menten JOM, Passos JR (2008) Intensidade do Mal das Folhas em plantas jóvenes e adultas de seis clones de seringueira na região do Vale do Ribeira. *Tropical Plant Pathology* 33(2): 130-137

Gabriel, KR (1981) Biplot display of multivariate matrices for inspection of data and diagnosis. In V. Barnett (Ed.), *Interpreting Multivariate Data*. London: Wiley.

Gasparotto L, Zambolim L, Maffia LA, Ribeiro DO, Vale FX, Junqueira NTV (1989) Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção de seringueira (*Hevea spp.*) por *Microcyclus ulei*. *Fitopatol bras* 14:1

Gasparotto L, Santos AF, Pereira JCR, Ferreira FA (1997) Doenças da seringueira no Brasil. Embrapa-SPI. Brasília, BR, p 168

Gasparotto L, Ferreira FA, Dos Santo AF, Rezende PJC, Furtado EL (2012) Capítulo 3: Doenças das folhas. En: Gasparotto L, Pereira RJC (eds) *Doenças da seringueira no Brasil*. EMBRAPA Amazônia Ocidental Brasília, DF, pp 39-176

Gutiérrez, H, Vara, R (2012) *Análisis de diseño de experimentos* (Vol. Tercera edición). México D.F. Mc Graw Hill.

Hallé F, Oldeman R, Tomlinson PB (1978) *Tropical trees and forest*. Springer-verlag, Berlin, DE, p 441

Hocking, RR (1996) *Methods and Applications of Linear Models. Regression and the Analysis of Variance*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Hora Júnior, B.Td, de Macedo, D.M., Barreto, R.W., Evans, H.C., Mattos, C.R.R., et al. (2014) Erasing the Past: A New Identity for the Damoclean Pathogen Causing South American Leaf Blight of Rubber. *PLoS ONE* 9 (8): e104750. doi:10.1371/journal.pone.0104750

IGAC Instituto Geográfico Agustín Codazzi, CO (2010) Caquetá, características geográficas. Imprenta nacional de Colombia. Bogotá, DC, p 373

IRSG (International Rubber Study Group, SI) (2015) Rubber Statistical Bulletin. Noviembre de 2014. Fecha de consulta: 2 de Abril de 2015. Disponible en: <http://www.rubberstudy.com/statistics.aspx>

Junqueira NTV, Chaves GM, Zambolim L, Romeiro R da S, Gasparotto L (1984) Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. *Revista Ceres* (31):322-331

Junqueira NTV, Laércio Z, Geraldo MC, Alcelio C, Gasparotto L (1988) Reação de Clones de Seringueira a Vários Isolados de *Microcyclus ulei*. Pesq agropec bras, Brasília 23(8):877-893

Kuehl O, R (2001) Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. México: Thomson Learning.

Leal, F (1999) Impactos actuales y potenciales de las Enfermedades de los cultivos perennes de la amazonia y posibilidades de control para el desarrollo sostenible de la región. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaría Pro Tempore. Venezuela. 178 p.

Le Guen VA, Guyot JB, Mattos CCR, Seguin MA, Garcia D (2008) Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. Crop Protection 27:1498-1503

Lekawipat N, Teerawatanasuk K, Rodier-Goud M, Seguin M, Vanavichit A, Toojinda T, Tragoonrung S (2003) Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg By using microsatellite markers. Journal of Rubber Research 6(1):36-47

Lespinnasse D, Roider-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M (2000) A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) bases on RPLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. Theoretical Applied Genetics 100:127-138

Lieberei, R, Fock, HP, Biehl, B (1996) Cyanogenesis inhibits active pathogen defense in plants: Inhibition by gaseous HCN of photosynthetic CO₂-fixation and respiration in intact leaves. Angewandte Botanik 70: 230–238.

Lieberei R (2007) South american leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. Invited Review Annal of Botany 100:1125-1142

Lichtenthaler HK, Miehe JA (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. Trends Plant Sci 2:316-320

Lucas JA (1998) Plant pathology and plant pathogens. Blackwell Science, Oxford

Mattos CRR (1999) Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. Fitopatologia Brasileira, p 470

Mattos CRR, García D, Pinard F, Le Guen V (2003) Variabilidade de Isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste de Bahia. Fitopatologia Brasileira 28(5):502-507

Mattos, CRR, García, D, Le Guen, V (2005) Seleção de Clones de Seringueira com Alta Produção e Resistentes ao Mal-Das-Folhas. Ceplac. Comunicação técnico 28: 1-9.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. Journal of Experimental Botany 51(345):659-668

Montgomery, D (2004) Diseño y análisis de experimentos (Segunda edición ed.). México: Limusa Wilwy

Nelder, JA (1994) The Statistics of Linear Models: Back to Basics. Statistics and Computing, 4: 243-256.

Pérez, W, Forbes, G (2008) El tizón tardío de la papa, Manual técnico. Centro internacional de la papa (CIP). Macmillan and Co. Ltd. London 278p.

Pinkard EA, Mohammed CL (2006) Photosynthesis of Eucalyptus globulus with Mycosphaerella leaf disease. New Phytol 170:119-127

Pinheiro J, Bates D, Saikat D (2013) Deepayan Sarkar and the R development core team. Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version (3):1-109

Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJT, Cruz MFA, Curvelo CRS, DaMatta FM, Vale FXR (2014) Photosynthetic gas exchange and antioxidative system in common bean plants infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and supplied with silicon. Tropical Plant Pathology 39(1):35-42

R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Fecha de consulta: 21 de junio de 2016. Disponible en: <http://www.R-project.org/>

Rios JA, Rodrigues FA, Debona D, Silva LC (2014) Photosynthetic gas exchange in leaves of wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae*. Acta Physiol Plant 36:371-379

Rivano F, Martínez M, Cevallos V, Cilas C (2010) Assessing resistance of rubber tree clones to *Microcyclus ulei* in large-scale clone trials in Ecuador: a less time-consuming field method. Eur J Plant Pathol 126:541-552

Rivano F, Mattos CRR, Cardoso SEA, Martinez M, Cevallos V, Le Guen V, Garcia D (2013) Breeding *Hevea brasiliensis* for yield, growth and SALB resistance for high disease environments. Industrial Crops and Products 44: 659-670

Rodríguez-Gaviria, PA, Cayón, G (2008) Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana* 26(2): 256-265.

STNCC Secretaria Técnica Nacional De La Cadena De Caucho (2008) Comportamiento del caucho natural en Colombia y el mundo 2002 – 2008. Ed. OE Santacruz. 26 p.

Sterling A, Rodríguez OL, Quintero L, Correa J (2009) Evaluación fitosanitaria y resistencia en campo a *Microcyclus ulei* de *Hevea brasiliensis* en la Amazonia Colombiana. *Revista Colombia Amazónica* 2:80-90

Sterling A, Calderón A, Rodríguez OL, Quintero L (2010) Caracterización morfológica y patogenicidad de *Microcyclus ulei* en la Amazonia colombiana. *Revista Colombia Amazónica* 3:99-116

Sterling A, Rodríguez CH (2011) Nuevos clones de caucho natural para la Amazonia Colombiana: Énfasis en la resistencia al Mal Suramericano de las Hojas (*Microcyclus ulei*). Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. Bogotá, Colombia, p 195

Sterling, A, Melgarejo, LM (2014) Variación temporal a *Microcyclus ulei* en los clones de caucho FX 3864 y FX 4098 en condiciones controladas *Revista Colombiana de Biotecnología* 16: 158 – 168.

Sterling, CA, Rodríguez, LCH, Melgarejo, LM (2015). Evaluación inicial del asocio caucho – copoazú en el Caquetá: una alternativa de enriquecimiento agroforestal con potencial para la Amazonia colombiana. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas–SINCHI.

ANEXOS

Anexo 1. Sentencias en RStudio para el análisis de varianza de la severidad y el AUSPC

#Severidad

```
Severidadt<- read_excel("~/Desktop/Objetivo 1 ok/Severidadt.xlsx")
View(Severidadt)
attach(Severidadt)
modelo1<-glms(severidad~1+clon+tiempo+tiempo:clon
              ,correlation=corCompSymm(form=~1|parcela)
              ,method="REML"
              ,na.action=na.omit
              ,data=Severidadt)
summary(modelo1)
anova(modelo1)
```

#Comparaciones post-hoc

```
install.packages("multcomp")
library(multcomp)
mmod.t.test <- glht(modelo1, linfct=mcp(Clon="Tukey"))
summary(mmod.t.test)
```

```
intervals<-TukeyHSD(modelo1)
intervals
```

#Supuestos

```
Res <- residuals(modelo1, type="normalized")
Fit <- fitted(modelo1)
par(mfrow=c(2,3))
plot(Res ~ Fit, xlab="Fitted values", ylab="Residuals", main="Residuals vs. fitted")
abline(h=0)
plot(Res ~ Severidadt$severidad, xlab="Severidad", ylab="Residuals", main =
"Severidad")
abline(h=0)
boxplot(Res ~ Severidadt$clon, ylab="Residuals", main="Clon")
abline(h=0, lty=3)
boxplot(Res ~ Severidadt$tiempo, ylab="Residuals", main="Tiempo")
abline(h=0, lty=3)
hist(Res, main="Histogram of residuals", xlab="Residuals")
qqnorm(Res)
qqline(Res)
```

#AUSPC

```
library(readxl)
```

```

AUSPCt <- read_excel("~/Desktop/Objetivo 1 ok/AUSPCt.xlsx")
View(AUSPCt)
attach(AUSPCt)

#Utilizando función de Anova y modelos lineales lm
modelo1 <- aov(AUSPC ~ Clon, data=AUSPCt)
summary(modelo1)
model.tables(modelo1, type = "mean")
modelo2 <- lm(AUSPC ~ Clon, data=AUSPCt)
anova(modelo2)
summary(modelo2)

#Utilizando modelos lineales generales y mixtos
install.packages(c("lme4", "nlme"), dep=T)
library(nlme)
library(lme4)
modelo3<-glms(AUSPC~1+Clon,method="REML",na.action=na.omit,data=AUSPCt)
summary(modelo3)
anova(modelo3)

#Comparaciones post-hoc
install.packages("multcomp")
library(multcomp)
mmod.t.test <- glht(modelo2, linfct=mcp(Clon="Tukey"))
summary(mmod.t.test)

#Supuestos
Res <- residuals(modelo3, type="normalized")
Fit <- fitted(modelo3)
par(mfrow=c(2,2))
plot(Res ~ Fit, xlab="Fitted values", ylab="Residuals", main="Residuals vs. fitted")
abline(h=0)
plot(Res ~ AUSPCt$AUSPC, xlab="AUSPC", ylab="Residuals", main = "AUSPC")
abline(h=0)
boxplot(Res ~ AUSPCt$Clon, ylab="Residuals", main="Clon")
abline(h=0, lty=3)
hist(Res, main="Histogram of residuals", xlab="Residuals")
qqnorm(Res)
qqline(Res)

```

Anexo 2. Sentencia general en RStudio para el análisis de varianza de los parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila *a*

```
library(readxl)
Fisiologiat <- read_excel("~/Desktop/Objetivo 2 ok/Fisiologiat.xlsx")
Fisiologiat
View(Fisiologiat)
attach(Fisiologiat)

#Utilizando modelos lineales generales y mixtos
install.packages(c("lme4", "nlme"), dep=T)
library(nlme)
library(lme4)

#var = variables de interés (A, E, gs, WUE, Fv/Fm, qP, Fv'/Fm', NPQ, ETR)
modelo<-
glsl(var~1+Tiempo+Clon+Tratamiento+Tiempo:Clon+Tiempo:Tratamiento+Clon:Tratamiento+Tiempo:Clon:Tratamiento
      ,weights=varComb(varIdent(form=~1|Tiempo))
      ,correlation=corCompSymm(form=~1|Parcela)
      ,method="REML"
      ,na.action=na.omit
      ,data=Fisiologiat)
summary(modelo)
anova(modelo)

#Comparaciones post-hoc, var
install.packages("multcomp")
library(multcomp)
mmod.t.test <- glht(modelo, linfct=mcp(Clon="Tukey"))
summary(mmod.t.test)

#Supuestos, var
Res <- residuals(modelo, type="normalized")
Fit <- fitted(modelo)
par(mfrow=c(2,2))
plot(Res ~ Fit, xlab="Fitted values", ylab="Residuals", main="Residuals vs. fitted")
abline(h=0)
plot(Res ~ Fisiologiat$var, xlab="var", ylab="Residuals", main = "var")
abline(h=0)
hist(Res, main="Histogram of residuals", xlab="Residuals")
qqnorm(Res)
qqline(Res)
```

Anexo 3. Sentencias en RStudio para el análisis de correlación y de componentes principales entre el SALB y los parámetros fisiológicos

#Correlación

```
library(readxl)
Correlacion <- read_excel("~/Desktop/Objetivo 3 ok/Correlacion.xlsx")
View(Correlacion)
attach(Correlacion)
#####
#Correlaciones intercambio B y C (m y n)
m<-Correlacion[c(1:15),c(2:6)]
m
# Correlaciones entre las variables de "m"
p <- cor(m) # Correlación de Pearson
cat("Correlación de Pearson\n")
print(p)
# Test de correlación entre dos variables de m (y así respectivamente para cada par)
test <- cor.test(m$Severidad,m$E)
print(test)
n<-Correlacion[c(16:30),c(2:6)]
n
# Correlaciones entre las variables de "n"
p <- cor(n) # Correlación de Pearson
cat("Correlación de Pearson\n")
print(p)
# Test de correlación entre dos variables de n (y así respectivamente para cada par)
test <- cor.test(n$Severidad,n$E)
print(test)
#####
#Correlaciones fluorescencia B y C (q y r)
q<-Correlacion[c(1:15),c(2, 7:11)]
q
# Correlaciones entre las variables de "q"
p <- cor(q) # Correlación de Pearson
cat("Correlación de Pearson\n")
print(p)
# Test de correlación entre dos variables de q (y así respectivamente para cada par)
test <- cor.test(q$Severidad,q$Fv.Fm)
print(test)
r<-Correlacion[c(16:30),c(2, 7:11)]
r
# Correlaciones entre las variables de "r"
p <- cor(r) # Correlación de Pearson
```



```

cat("Correlación de Pearson\n")
print(p)
# Test de correlación entre dos variables de r (y así respectivamente para cada par)
test <- cor.test(r$Severidad,r$Fv.Fm)
print(test)

```

#Análisis de componentes principales

```

library(readxl)
Multivariada2 <- read_excel("~/Desktop/Objetivo 3 ok/Multivariada2.xls")
View(Multivariada2)
datos<-Multivariada2[,-c(1)]
datos
#A partir de la matriz de correlación
acp <- prcomp(datos, scale = TRUE)
acp
#Para obtener los autovalores
acp$sdev^2
#Correlaciones entre Variables y Componentes
(corvar <- acp$rotation %*% diag(acp$sdev))
#Nuevas coordenadas
acp$x
#Porcentaje de varianza total
barplot(summary(acp)$importance[2, ])

#Correlación entre Variables y CP1 y CP2
plot(-1:1, -1:1, type='n', asp=1, xlab='CP1', ylab='CP2')
abline(h=0, v=0, lty=2, col=8)
## Dibuja un círculo de centro (0,0) y radio 1
symbols(0, 0, 1, inches=F, add=T)
symbols(0, 0, sqrt(.5), inches=F, add=T)

## Dibuja los vectores y coloca los nombres
arrows(0, 0, corvar[,1], corvar[,2], length=.1)
text(corvar[,1], corvar[,2], colnames(datos), pos=4, offset=.6, col=2, font=2)

#Gráfico de individuos (Tratamiento.Clon)

plot(acp$x[, 1:2], pch = 19)
abline(h = 0, v = 0, lty = 2, col = 8)

#Biplot
biplot(acp)
abline(h = 0, v = 0, lty = 2, col = 8)

```

Anexo 4. Medias ajustadas y errores estándares para las variables de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila a para la interacción de mayor orden: Tiempo*Clon*Tratamiento

E - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.	
20	FX 4098	NI	1,06	0,02	A
16	FX 4098	NI	0,94	0,03	B
20	FX 3864	NI	0,85	0,02	C
8	FX 3864	NI	0,81	0,05	C D
16	FX 3864	NI	0,80	0,03	C D
12	FX 4098	NI	0,76	0,05	C D E
20	FX 4098	I	0,73	0,02	D E
12	FX 4098	I	0,73	0,05	D E F
4	FX 3864	NI	0,72	0,01	D E F
16	FX 4098	I	0,72	0,03	D E F
12	FX 3864	NI	0,66	0,05	E F G
12	FX 3864	I	0,64	0,05	E F G H
8	FX 4098	NI	0,62	0,05	F G H I
4	FX 4098	NI	0,60	0,01	G H I
4	FX 4098	I	0,60	0,01	G H I
0	FX 4098	NI	0,59	0,01	G H I
0	FX 4098	I	0,59	0,01	G H I
0	FX 3864	NI	0,59	0,01	G H I
8	FX 4098	I	0,58	0,05	G H I J
0	FX 3864	I	0,56	0,01	H I J
4	FX 3864	I	0,52	0,01	I J
8	FX 3864	I	0,45	0,05	J K
16	FX 3864	I	0,44	0,03	K
20	FX 3864	I	0,35	0,02	K

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

gs - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.	
16	FX 3864	NI	0,67	0,03	A
20	FX 3864	NI	0,58	0,01	B
12	FX 3864	NI	0,36	0,02	C
0	FX 3864	NI	0,34	0,04	C D
0	FX 3864	I	0,33	0,04	C D E
16	FX 4098	NI	0,25	0,03	D E F
20	FX 4098	NI	0,25	0,01	E F
4	FX 3864	NI	0,24	3,8E-03	F
4	FX 3864	I	0,24	3,8E-03	F
20	FX 4098	I	0,20	0,01	F G
12	FX 3864	I	0,20	0,02	F G
16	FX 4098	I	0,18	0,03	F G
8	FX 3864	I	0,18	0,01	F G
12	FX 4098	NI	0,17	0,02	F G
12	FX 4098	I	0,17	0,02	F G
16	FX 3864	I	0,17	0,03	F G
8	FX 4098	NI	0,16	0,01	G
8	FX 4098	I	0,16	0,01	G
4	FX 4098	NI	0,15	3,8E-03	G
4	FX 4098	I	0,14	3,8E-03	G
20	FX 3864	I	0,14	0,01	G
8	FX 3864	NI	0,14	0,01	G
0	FX 4098	I	0,13	0,04	G
0	FX 4098	NI	0,13	0,04	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

A - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.	
20	FX 4098	NI	3,65	0,09	A
16	FX 4098	NI	3,25	0,09	B
20	FX 4098	I	2,94	0,09	C
20	FX 3864	NI	2,93	0,09	C
12	FX 4098	NI	2,93	0,12	C D
12	FX 4098	I	2,91	0,12	C D
16	FX 4098	I	2,82	0,09	C D E
16	FX 3864	NI	2,67	0,09	D E F
12	FX 3864	NI	2,57	0,12	E F
12	FX 3864	I	2,50	0,12	F
16	FX 3864	I	1,50	0,09	G
20	FX 3864	I	0,86	0,09	H
8	FX 4098	NI	-0,81	0,10	I
8	FX 3864	NI	-1,37	0,10	J
4	FX 4098	NI	-1,69	0,14	J
4	FX 4098	I	-5,43	0,14	K
0	FX 4098	NI	-5,65	0,19	K L
0	FX 4098	I	-5,73	0,19	K L
8	FX 4098	I	-5,80	0,10	L
4	FX 3864	NI	-6,22	0,14	M
0	FX 3864	NI	-6,44	0,19	M
4	FX 3864	I	-6,55	0,14	M
0	FX 3864	I	-6,62	0,19	M
8	FX 3864	I	-11,66	0,10	N

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

WUE - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.	
12	FX 4098	I	4,35	0,41	A
20	FX 4098	I	4,03	0,17	A
16	FX 4098	I	3,95	0,19	A B
12	FX 3864	NI	3,90	0,41	A B
12	FX 3864	I	3,90	0,41	A B
12	FX 4098	NI	3,86	0,41	A B
16	FX 4098	NI	3,48	0,19	A B
20	FX 3864	NI	3,45	0,17	B
20	FX 4098	NI	3,45	0,17	B
16	FX 3864	I	3,44	0,19	B
16	FX 3864	NI	3,43	0,19	B
20	FX 3864	I	2,38	0,17	C
8	FX 4098	NI	-1,31	1,01	D
8	FX 3864	NI	-1,69	1,01	D
4	FX 4098	NI	-2,80	0,23	D
4	FX 3864	NI	-8,67	0,23	E
4	FX 4098	I	-9,11	0,23	E F
0	FX 4098	NI	-9,53	0,42	E F
0	FX 4098	I	-9,78	0,42	F
8	FX 4098	I	-10,95	1,01	F G
0	FX 3864	NI	-11,00	0,42	G
0	FX 3864	I	-11,87	0,42	G
4	FX 3864	I	-12,61	0,23	G
8	FX 3864	I	-26,11	1,01	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fv.Fm - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.			
12	FX 4098	I	0,86	0,01	A		
20	FX 4098	NI	0,85	0,02	A	B	
12	FX 4098	NI	0,85	0,01	A	B	
4	FX 3864	NI	0,85	0,01	A	B	
4	FX 4098	I	0,84	0,01	A	B	
16	FX 3864	NI	0,84	0,02	A	B	
20	FX 3864	NI	0,84	0,02	A	B	
16	FX 4098	I	0,84	0,02	A	B	
0	FX 4098	I	0,84	0,01	A	B	
8	FX 3864	NI	0,83	0,02	A	B	
12	FX 3864	I	0,83	0,01	A	B	
0	FX 4098	NI	0,83	0,01	A	B	
8	FX 4098	I	0,83	0,02	A	B	
8	FX 4098	NI	0,83	0,02	A	B	
0	FX 3864	NI	0,83	0,01		B	
0	FX 3864	I	0,82	0,01		B	
12	FX 3864	NI	0,82	0,01		B	
4	FX 4098	NI	0,82	0,01		B	
4	FX 3864	I	0,81	0,01		B	
16	FX 4098	NI	0,81	0,02		B	C
16	FX 3864	I	0,76	0,02		C	D
8	FX 3864	I	0,75	0,02			D
20	FX 3864	I	0,73	0,02			D
20	FX 4098	I	0,72	0,02			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

NPQ - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.			
0	FX 4098	I	0,08	0,03	A		
12	FX 3864	I	0,07	0,01	A		
20	FX 3864	NI	0,05	0,01	A		
16	FX 3864	NI	0,05	0,02	A		
20	FX 4098	NI	0,04	0,01	A		
20	FX 4098	I	0,03	0,01	A		
16	FX 4098	I	0,03	0,02	A		
16	FX 3864	I	0,03	0,02	A		
20	FX 3864	I	0,03	0,01	A		
8	FX 3864	NI	0,03	4,9E-03	A		
16	FX 4098	NI	0,03	0,02	A		
4	FX 3864	I	0,03	3,5E-03	A		
8	FX 3864	I	0,02	4,9E-03	A		
0	FX 3864	I	0,02	0,03	A		
12	FX 3864	NI	0,02	0,01	A		
12	FX 4098	I	0,02	0,01	A		
0	FX 4098	NI	0,02	0,03	A		
4	FX 4098	NI	0,02	3,5E-03	A		
4	FX 4098	I	0,02	3,5E-03	A		
4	FX 3864	NI	0,02	3,5E-03	A		
12	FX 4098	NI	0,02	0,01	A		
8	FX 4098	NI	0,02	4,9E-03	A		
8	FX 4098	I	0,02	4,9E-03	A		
0	FX 3864	NI	0,01	0,03	A		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ETR - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.	
20	FX 4098	NI	0,69	0,06	A
20	FX 4098	I	0,52	0,06	B
16	FX 4098	NI	0,41	0,07	B C
16	FX 3864	NI	0,32	0,07	C D
12	FX 4098	I	0,31	0,03	C D
0	FX 4098	I	0,31	0,04	C D
0	FX 4098	NI	0,28	0,04	C D
12	FX 4098	NI	0,27	0,03	C D
16	FX 3864	I	0,25	0,07	C D E
16	FX 4098	I	0,25	0,07	C D E
12	FX 3864	I	0,24	0,03	C D E
4	FX 3864	I	0,24	0,03	C D E
8	FX 3864	NI	0,24	0,05	C D E
20	FX 3864	NI	0,24	0,06	C D E
0	FX 3864	NI	0,22	0,04	D E
12	FX 3864	NI	0,21	0,03	D E
20	FX 3864	I	0,17	0,06	D E F
4	FX 3864	NI	0,17	0,03	E F
0	FX 3864	I	0,16	0,04	E F
8	FX 4098	I	0,13	0,05	E F
8	FX 3864	I	0,12	0,05	E F
8	FX 4098	NI	0,12	0,05	E F
4	FX 4098	I	0,11	0,03	E F
4	FX 4098	NI	0,06	0,03	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

qP - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.	
20	FX 4098	NI	0,25	0,02	A
20	FX 4098	I	0,19	0,02	B
16	FX 4098	NI	0,13	0,01	C
12	FX 4098	I	0,11	0,01	D
12	FX 4098	NI	0,10	0,01	D
0	FX 4098	I	0,09	0,01	D
8	FX 3864	NI	0,09	0,02	D E
16	FX 3864	I	0,09	0,01	D E
12	FX 3864	I	0,09	0,01	D E
12	FX 3864	NI	0,09	0,01	D E
16	FX 4098	I	0,09	0,01	D E
20	FX 3864	NI	0,08	0,02	D E F
0	FX 4098	NI	0,08	0,01	D E F
16	FX 3864	NI	0,07	0,01	D E F
4	FX 3864	I	0,07	0,01	D E F
0	FX 3864	NI	0,07	0,01	D E F
20	FX 3864	I	0,07	0,02	D E F G
4	FX 3864	NI	0,05	0,01	E F G
0	FX 3864	I	0,05	0,01	E F G
8	FX 4098	NI	0,04	0,02	E F G H
8	FX 4098	I	0,04	0,02	E F G H
8	FX 3864	I	0,04	0,02	F G H
4	FX 4098	I	0,04	0,01	G H
4	FX 4098	NI	0,02	0,01	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fv'.Fm' - Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo*Clon*Tratamiento

Tiempo	Clon	Tratamiento	Medias	E.E.			
12	FX 4098	I	0,86	0,01	A		
20	FX 4098	NI	0,85	0,02	A	B	
12	FX 4098	NI	0,85	0,01	A	B	
4	FX 3864	NI	0,85	0,01	A	B	
4	FX 4098	I	0,84	0,01	A	B	
16	FX 3864	NI	0,84	0,02	A	B	
20	FX 3864	NI	0,84	0,02	A	B	
16	FX 4098	I	0,84	0,02	A	B	
0	FX 4098	I	0,84	0,01	A	B	
8	FX 3864	NI	0,83	0,02	A	B	
12	FX 3864	I	0,83	0,01	A	B	
0	FX 4098	NI	0,83	0,01	A	B	
8	FX 4098	I	0,83	0,02	A	B	
8	FX 4098	NI	0,83	0,02	A	B	
0	FX 3864	NI	0,83	0,01		B	
0	FX 3864	I	0,82	0,01		B	
12	FX 3864	NI	0,82	0,01		B	
4	FX 4098	NI	0,82	0,01		B	
4	FX 3864	I	0,81	0,01		B	
16	FX 4098	NI	0,81	0,02		B	C
16	FX 3864	I	0,76	0,02		C	D
8	FX 3864	I	0,75	0,02			D
20	FX 3864	I	0,73	0,02			D
20	FX 4098	I	0,72	0,02			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)